

SÉRIE A - N° 1811.

N° D'ORDRE
2677

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

ELISABETH CORTEGGIANI.

1^{re} THÈSE — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACÉTYLCHOLINE LIBRE ET DISSIMULÉE
SOUS FORME D'UN COMPLEXE DANS LE CERVEAU

2^{me} THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Juin 1938, devant la Commission d'examen.

14 JUIN 1938

MM. ROBERT-LÉVY, *Président.*

COMBES
WURMSER } *Examineurs.*



DOULLENS

IMPRIMERIE CH. DESSAINT

1938

SÉRIE A - N° 1811

N° D'ORDRE
2677

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

ELISABETH CORTEGGIANI.

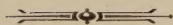
1^{re} THÈSE — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACÉTYLCHOLINE LIBRE ET DISSIMULÉE
SOUS FORME D'UN COMPLEXE DANS LE CERVEAU

2^{me} THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le Juin 1938, devant la Commission d'examen.

MM. ROBERT-LÉVY, *Président.*

COMBES	}	<i>Examineurs.</i>
WURMSER		



DOULLENS

IMPRIMERIE CH. DESSAINT

1938

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe.

Professeurs honoraires	H. LEBESGUE.	BLAISE.	G. BERTRAND.
	A. FERNBACH.	DANGEARD.	ABRAHAM.
	Emile PICARD.	LESPIEAU.	Ch. FABRY.
	Léon BRILLOUIN.	MARCHIS.	Léon BERTRAND.
	GUILLET.	VESSIoT.	WINTREBERT.
	PÉCHARD.	PORTIER.	DUBOSQ.
	FREUNDLER.	MOLLIARD.	BOHN.
	AUGER.	LAPICQUE.	

PROFESSEURS

M. CAULLERY.....	T Zoologie (Evolution des êtres organisés).	E. ESCLANGON	T Astronomie.
G. URBAIN.....	T Chimie générale.	M ^{me} RAMART-LUCAS	T Chimie organique.
Emile BOREL.....	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	H. BÉGHIN	T Mécanique physique et expérimentale.
Jean PERRIN	T Chimie physique.	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
A. CARTAN.....	T Géométrie supérieure.	PAUTHENIER	Physique (P.C.B.).
A. COTTON	T Recherches physiques.	De BROGLIE	T Théories physiques.
J. DRACH	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	CHRÉTIEN	Optique appliquée.
Charles PÉREZ....	T Zoologie.	P. JOB	Chimie générale.
E. RABAUD	T Biologie expérimentale.	LABROUSTE	Physique du Globe.
M. GUICHARD	Chimie minérale.	PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.
Paul MONTEL.....	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	VILLEY	Mécanique physique et expérimentale.
L. BLARINGHEM ...	T Botanique.	COMBES	T Physiologie végétale.
G. JULIA	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	GARNIER	T Mathématiques générales.
C. MAUGUIN	T Minéralogie.	PÉRÈS	Mécanique théorique des fluides.
A. MICHEL-LÉVY..	T Pétrographie.	HACKSPILL	Chimie (P.C.B.).
H. BÉNARD	T Mécanique expérimentale des fluides.	LAUGIER	T Physiologie générale.
A. DENJOY	T Application de l'analyse à la Géométrie.	TOUSSAINT	Technique Aéronautique.
L. LUTAUD	T Géographie physique et Géologie dynamique.	M. CURIE	Physique (P.C.B.).
Eugène BLOCH....	T Physique.	G. RIBAUD	T Hautes températures.
G. BRUHAT	T Physique.	CHAZY	T Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS	T Enseignement de Physique.	GAULT	Chimie (P.C.B.).
A. DEBIERNE.....	T Physique générale et Radio-activité.	CROZE	Recherches physiques.
A. DUFOUR	T Physique (P.C.B.).	DUPONT	T Théories chimiques.
L. DUNOYER	Optique appliquée.	LANQUINE	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND.	T Botanique.	VALIRON	Mathématiques générales.
M. JAVILLIER	T Chimie biologique.	BARRABÉ	Géologie structurale et Géologie appliquée.
ROBERT-LÉVY	T Physiologie comparée.	MILLOT	Biologie animale (P.C.B.).
F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	F. PERRIN.....	Théories physiques.
Henri VILLAT	T Mécanique des fluides et applications.	VAVON	Chimie organique.
Ch. JACOB	T Géologie.	G. DARMOIS	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
P. PASCAL	T Chimie minérale.	CHATTON	T Biologie maritime.
M. FRÉCHET	T Calcul différentiel et Calcul intégral.	AUBEL	Chimie biologique.
		Jacques BOURCART	Géographie physique et Géologie dynamique.
		M ^{me} JOLIOT-CURIE.	Physique générale et Radio-activité.
		PLANTEPOL	Biologie végétale (P.C.B.).
		CABANNES	Enseignement de Physique.
		GRASSÉ	Biologie animale (P.C.B.).
		PRÉVOST	Chimie (P.C.B.).

Secrétaire

Secrétaire honoraire.....

A. PACAUD.

D. TOMBECK.



CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DE L'ACÉTYLCHOLINE LIBRE
ET DISSIMULÉE SOUS FORME
D'UN COMPLEXE DANS LE CERVEAU.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

A MA FAMILLE

A MON MAITRE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. GAUTRELET,

Directeur du Laboratoire de Biologie expérimentale
à l'Ecole pratique des Hautes Etudes.

*Témoignage de respectueuse affection
et de profonde reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR ROBERT LEVY

A MONSIEUR LE PROFESSEUR COMBES

A MONSIEUR LE PROFESSEUR WURMSER

Hommage respectueux et reconnaissant.

INTRODUCTION

L'intervention de l'Acétylcholine en tant que médiateur chimique dans le fonctionnement du système nerveux végétatif est un fait établi depuis les expériences de LÆWI (1921), et généralement admis (Cf. H. FREDERICQ, 1927, L. LAPICQUE, 1934, Z.-M. BACQ, 1935 a, GADDUM, 1936); le mécanisme a même été étendu au système nerveux de la vie de relation (DALE et FELDBERG, 1934).

J. GAUTRELET dès 1909, avant que n'en fut précisée par CANON et BACQ (1931) la notion, accordait à l'adrénaline, à la suite d'une série d'expériences sur l'ablation des surrénales, un rôle essentiel dans l'excitabilité du sympathique. « Que les surrénales, écrivait-il, sécrètent une substance à laquelle le sympathique soit redevable de son activité, au moins en partie, le fait ne paraît pas douteux » (J. GAUTRELET et L. THOMAS, 1911) ; et il attribuait à la choline, dont il montrait la présence dans la plupart des organes des animaux (1909 a) pourvus de surrénales ou d'organes chromaffines, les vertébrés avant tout, un rôle antagoniste. « LANGLEY, ELLIOTT ont remarqué qu'il existait une identité absolue entre l'action de l'adrénaline et l'excitabilité du sympathique, LÉPINE admit récemment que l'adrénaline sécrétée par les cellules chromaffines contigües aux fibres sympathiques pourrait diffuser directement jusqu'à ces dernières et pénétrer dans l'organisme par voie nerveuse. Rien n'empêche d'admettre que la choline, sécrétée par le pancréas en particulier, pénètre, elle aussi, directement dans les nerfs ». (J. GAUTRELET, 1909 b).

Actuellement, à l'hypothèse d'une transmission neuro-humorale à distance, de l'acétylcholine tout au moins, a été généralement substituée la notion d'une véritable sécrétion nerveuse. « All these transmitters of short duration are chemical substances which the nerve impulses cause to be secreted from the nerve endings ». (ECCLES, 1937). Au terme de choline, telle que l'envisageait J. GAUTRELET, il suffit de substituer celui de son ester dont HUNT et de TAVEAU (1906) ont montré l'activité phy-

siologique infiniment supérieure [Cf. VILLARET, Justin BESANÇON et CACHERA (1934), LANARI (1936)] pour voir posée sous le jour de la neurocrinie (cf. R. COLLIN, 1937, ROUSSY et MOSINGER, 1937) la conception actuelle de l'antagonisme des deux systèmes adrénergique et cholinergique (DALE, 1933).

Il nous a paru opportun de poursuivre, en vue de notre thèse, des recherches dans la lignée des travaux du laboratoire auquel il nous est donné de collaborer depuis sept ans. Quelques auteurs ont suggéré récemment que l'acétylcholine, en tant qu'intermédiaire chimique, trouvait son origine dans un précurseur. C'est à l'existence et à la caractérisation de ce complexe dans les centres nerveux en particulier, où se pose aujourd'hui par ailleurs la question de l'intervention synaptique de l'acétylcholine, que nous nous sommes attachée. Après avoir précisé la technique utilisée dans nos recherches, nous montrerons que le cerveau renferme, en suspension aqueuse, en outre de l'acétylcholine libre, une quantité importante d'acétylcholine dissimulée et nous nous efforcerons de définir les caractères chimiques du complexe dans lequel celle-ci est engagée. Nous poursuivrons notre inventaire dans la série animale et essaierons de préciser quelques conditions physiologiques modifiant le rapport de l'acétylcholine libre et de son complexe d'origine.

La connaissance procède par étapes : choline, acétylcholine, complexe acétylcholinique, tels nous apparaissent aujourd'hui les 3 stades d'une notion fondamentale, éclairant la physiologie nerveuse et soulignant la complexité des phénomènes biologiques.

Cette étude a été effectuée au Laboratoire de Biologie expérimentale de l'Ecole pratique des Hautes Etudes, sous la direction de Monsieur le Professeur J. GAUTRELET. Qu'il nous soit permis, en tête de ce travail, d'exprimer nos sentiments de profonde reconnaissance à ce maître si distingué et si bienveillant qui nous a donné le goût de la recherche et nous a prodigué, en maintes circonstances, ses encouragements et le témoignage d'une affectueuse sollicitude.

Nous remercions Monsieur le Professeur Robert LÉVY qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre thèse.

Nous adressons également nos remerciements à Monsieur le Professeur WURMSER qui, à la suite de l'accueil dont nous avaient honoré Monsieur le Professeur LAPICQUE et Monsieur le Professeur LAUGIER, dans le laboratoire de Physiologie de la Faculté des Sciences, a bien voulu apporter ses suggestions à notre thèse et en être le Rapporteur :

Que Monsieur le Professeur COMBES, veuille bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance pour l'accueil toujours bienveillant qu'il nous a réservé dans son laboratoire.

Nous adressons nos sentiments de profonde gratitude à Monsieur le Professeur PEREZ qui a bien voulu nous permettre de poursuivre, à la station biologique de ROSCOFF, nos recherches sur les Invertébrés marins ; nous remercions également MM. TEISSIER, DRACH et MANIGAULT qui, au cours de notre séjour, nous ont aidée de leurs conseils éclairés.

Notre gratitude va aussi à nos camarades de laboratoire, Madame A. CARAYON-GENTIL, A. KASWIN, H. SCHEINER et A. PELOU dont l'amicale assistance nous a été d'un précieux secours ; nous leur exprimons ici nos sentiments de très sincère amitié.

CHAPITRE I

Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les milieux biologiques

Nous envisagerons tout d'abord les divers procédés d'extraction de l'acétylcholine des milieux biologiques. Sa très grande solubilité, tant dans l'eau que dans l'alcool, l'acétone, l'acide trichloracétique et métaphosphorique permettra l'utilisation de ces solvants même en quantité faible.

§ 1. — Méthodes d'extraction

a) *Extrait alcoolique.* — L'extraction de l'acétylcholine par l'alcool éthylique est le procédé le plus anciennement et le plus fréquemment utilisé. EWINS (1914) caractérisait l'acétylcholine dans l'extrait alcoolique de l'ergot de seigle. C'est également à partir des extraits alcooliques que WITANOWSKI (1925), DALE et DUDLEY (1929), ENGELHART (1930), recherchaient l'acétylcholine dans les organes de divers animaux.

Le tissu est prélevé directement dans 3 à 5 volumes d'alcool à 95° ou mieux d'alcool chlorhydrique ; en effet pour se mettre à l'abri de tout phénomène d'alcoolyse (LEMATTE, BOINOT et KAHANE, 1932), il est préférable de pratiquer l'extraction en milieu acide. On sait d'autre part que l'acétylcholine possède une stabilité maxima vers $pH = 3,9$ (HOFFMAN, 1930), aussi la plupart des auteurs utilisent l'extraction à l'alcool chlorhydrique

N
100 ; cependant CHANG et GADDUM (1933) préconisent l'emploi de l'alcool sulfurique, les extraits ainsi préparés filtrant plus rapidement que les extraits chlorhydriques. Après filtration et lavage du précipité, l'évaporation du filtrat est effectuée au bain-marie à 40° sous pression réduite. Le résidu est repris par l'eau et traité par l'éther pour le débarrasser des lipides.

Il est encore à remarquer que si en milieu alcoolique l'activité de la cholinestérase contenue normalement dans les tissus est suspendue, celle-ci n'est cependant pas toujours intégralement précipitée, et après évaporation de l'alcool elle peut détruire, tout au moins partiellement, l'acétylcholine contenue dans l'extrait ; toutefois l'acidité du milieu diminuant fortement l'activité de l'estérase (KAHANE, 1936), il semble dans ces conditions que l'on soit à l'abri de toute hydrolyse fermentaire. Cependant dans le cas où l'extrait devra être conservé plusieurs jours après évaporation de l'alcool il sera préférable d'ajouter de l'ésérine.

b) *Extrait acétonique.* — KAHLSON (1934) préconise pour l'extraction de l'acétylcholine l'emploi de l'acétone, cette méthode présentant sur la méthode alcoolique l'avantage d'une évaporation plus rapide du solvant.

Le tissu est traité par 7 à 10 volumes d'acétone et, après broyage, laissé en contact pendant 2 heures à la température du laboratoire. Après filtration et lavage du précipité, le liquide est évaporé sur bain de sable à 70° et traité avec l'éther de pétrole. Après décantation, l'éther de pétrole est évaporé.

c) *Extrait trichloracétique.* — GALEHR et PLATTNER (1928) utilisaient l'acide trichloracétique pour précipiter les substances protéiques du sang et arrêter la destruction de l'acétylcholine. CHANG et GADDUM (1933) ont adopté l'extraction trichloracétique pour la caractérisation et le dosage de l'acétylcholine dans nombre de tissus.

Les tissus sont pesés et traités par 2 volumes d'acide trichloracétique à 10 p. 100 et laissés en contact avec le solvant pendant 2 heures à température ordinaire ; après broyage, les extraits sont filtrés et le résidu est lavé avec de l'acide trichloracétique à 7 p. 100 ; les filtrats sont réunis et agités 4 à 5 fois avec de l'éther jusqu'à ce que le liquide ne présente plus qu'une réaction faiblement acide au rouge congo. La concentration de l'extrait est effectuée à 40° sous pression réduite jusqu'à ce que 1 cm³ d'extrait renferme 1 à 10 grs de tissu.

d) *Extrait métaphosphorique.* — BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER (1931) préconisent la désalbumination à l'aide de l'acide métaphosphorique à 5 p. 100. L'extrait obtenu après filtration est à pH = 3,6 — 3,8, ce qui permet une bonne conservation de l'acétylcholine. De plus, cette méthode évite les traitements à l'éther

nécessaires dans le cas de l'extraction trichloracétique. Il suffira de neutraliser l'extrait, s'il y a lieu, au moment du dosage de l'acétylcholine.

e) *Extrait aqueux ou salin.* — Etant donné la très grande solubilité de l'acétylcholine dans l'eau, ce solvant peut être utilisé, soit pur, soit en présence de sels (solutions de Ringer ou de chlorure de Na à 9 p. 1.000) pour extraire l'acétylcholine des tissus. Il est nécessaire dans ces conditions d'opérer l'extraction en présence d'ésérine afin d'éviter l'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase.

L'organe est broyé en présence d'eau ou de solution saline ésérinée. Il a été établi qu'une concentration de sulfate d'ésérine

à $\frac{1}{40.000}$ inactive complètement la diastase.

Nous préconisons particulièrement l'extraction aqueuse que nous utiliserons d'ailleurs constamment au cours de ce travail. Cette méthode, comme nous le verrons plus loin, permet le dosage direct de l'acétylcholine sur certains tests biologiques, ce qui entre autres avantages permet d'éviter les filtrations et évaporations nécessitées par les autres méthodes d'extraction précédemment décrites.

Cependant pour le dosage sur quelques tests biologiques (cœur de grenouille, pression sanguine) nous avons procédé à une filtration ou mieux à une ultrafiltration de l'extrait aqueux.

f) *Comparaison des différents modes d'extraction.* — Un grand nombre d'auteurs ont discuté la valeur des différents modes d'extraction de l'acétylcholine.

CHANG et GADDUM (1933) remarquent, pour la rate et l'intestin de cheval, que les extraits trichloracétiques sont de 12 à 30 p. 100 plus actifs que les extraits alcooliques des mêmes tissus. Ces faits sont d'ailleurs vérifiés sur la substance nerveuse par BARSOU (1935) ; cet auteur signale même que les extraits alcooliques de nerf perdent avec le temps une partie de leur activité acétylcholinique que le traitement par l'acide trichloracétique permet de récupérer, et il pense à une adsorption probable d'une partie de l'acétylcholine sur les substances en suspension ; en effet, l'extrait alcoolique, même après traitement par l'éther, contient toujours des substances non dissoutes. Pourtant il ne semble pas d'après certains auteurs que l'on doive tenir compte

du pouvoir adsorbant des substances organiques vis-à-vis de l'acétylcholine (E. KAHANE et Jeanne LÉVY, 1936, b).

O. LOEWI (1937, a, b) signalait récemment le rôle qu'était susceptible de jouer l'éther après traitement alcoolique, entraînant dans certaines conditions une quantité très importante d'acétylcholine.

PLATTNER et TSUDZIMURA (1935) montrent que tandis que l'acide trichloracétique libère une quantité d'acétylcholine plus grande que l'alcool pour le pancréas et le poumon, par contre, pour le cerveau, l'extrait alcoolique est plus riche que l'extrait trichloracétique.

Il y a toujours avantage quand il s'agit de l'acétylcholine à faire subir à l'extrait le minimum de traitements. PLATTNER et KRANNICH (1932) en purifiant leurs extraits par une série de traitements à l'alcool, suivis de distillations n'obtiennent que 1/30 de l'acétylcholine existant normalement dans le tissu (CHANG et GADDUM, 1933).

Quant aux extraits aqueux, renferment-ils des quantités d'acétylcholine équivalentes à celles des autres extraits ? il n'en est rien ; au cours de ce travail nous aurons l'occasion, et c'est là une donnée fondamentale à notre sens, de montrer que l'extrait aqueux éseriné de cervau, en particulier, renferme une quantité d'acétylcholine inférieure à celle des extraits alcoolique, acétonique ou trichloracétique. Il nous apparaîtra possible de considérer l'acétylcholine ainsi extraite comme existant à l'état *libre* dans le tissu alors que les extraits obtenus par les solvants organiques donneraient l'acétylcholine *totale*.

§ 2. — Méthodes de dosage

A. — METHODES CHIMIQUES

Ces méthodes sont basées sur les formes d'insolubilisation de l'acétylcholine : perchlorates, phosphotungstates et silicotungstates (LEMATTE, BOINOT et KAHANE E. et M., 1931), reineckates (KAPFHAMMER et BISCHOFF, 1930), chloraurates et chloroplatinafes (Cf. GULEWITSCH, 1898).

Etant donné les très faibles quantités d'acétylcholine présentes dans les tissus, beaucoup de ces méthodes ne peuvent être utilisées pour les dosages de l'acétylcholine des organes.

Par cristallisation sous forme de chloroplatinate, EWINS

(1914) caractérise l'acétylcholine dans l'ergot de seigle. En appliquant une méthode analogue DALE et DUDLEY (1929) isolent sous une forme chimiquement pure l'acétylcholine dans la rate de cheval.

KAPFHAMMER et BISCHOFF ont élaboré une méthode basée sur la précipitation de l'acétylcholine sous forme de reineckates que précisa E. KAHANE, en 1935. Nous nous bornerons à la description de cette méthode qui, à l'heure actuelle, a obtenu la faveur de nombre d'auteurs.

L'extrait alcoolique de sang ou de tissu est, après évaporation de l'alcool, désalbuminé complètement par l'acide trichloracétique ; après filtration et élimination de ce dernier par l'éther, le filtrat est concentré à faible volume. L'extrait obtenu est précipité par une solution saline de sel de Reinecke



jusqu'à coloration rose du liquide surnageant. Après 24 heures à la glacière, le précipité est recueilli par centrifugation et lavé à l'eau glacée puis à l'alcool absolu, enfin à l'éther anhydre et séché dans le vide. Après traitement par l'acétone anhydre et filtration, on évapore dans le vide sur anhydride phosphorique. Les reineckates de choline et d'acétylcholine ainsi obtenus sont dissous dans l'acétone diluée 1 : 1. La liqueur filtrée est traitée par le $\text{SO}_4 \text{Ag}^2$ à 6 p. 1.000, jusqu'à précipitation totale de l'acide de Reinecke sous forme de son sel d'argent. On filtre et à la liqueur limpide on ajoute une solution de BaCl_2 en quantité exactement équivalente à celle du $\text{SO}_4 \text{Ag}^2$ pour éliminer Ba^{++} et So^{4-} . Après filtration la liqueur est évaporée dans le vide à 30° jusqu'à faible volume et traitée par une solution saturée de chlorure d'or ; il se forme un précipité jaune cristallin. On abandonne à la glacière 24 heures. Le précipité est recueilli, lavé à l'eau glacée et purifié par 3 cristallisations dans l'eau chaude. Le chloraurate de choline plus soluble passe dans les eaux mères, le chloraurate d'acétylcholine est obtenu à l'état pur et est pesé après dessiccation ; il peut être identifié par son point de fusion (173°), par l'analyse élémentaire et le dosage de l'azote et de l'or.

Signalons encore que BEATTIE (1936) préconise à partir de la technique de Kapfhammer une méthode colorimétrique de dosage de la choline et de l'acétylcholine ; la solution acétonique de

reineckate de choline et d'acétylcholine permettrait un dosage de ces substances à une concentration de 3.10^{-6} .

B. — METHODES BIOLOGIQUES

L'acétylcholine, on le sait, est essentiellement douée de propriétés muscariniques et nicotiques suivant la classification de DALE (1914). Elle provoque à faible dose le ralentissement du cœur en même temps qu'elle en diminue l'amplitude et elle abaisse parallèlement la pression artérielle ; l'atropine supprime cette double action. Elle augmente le tonus de l'intestin et de l'utérus, effet aboli également par l'atropine.

En outre de ces propriétés de type muscarinique, elle provoque la contracture du muscle volontaire énervé de mammifère, du muscle droit de l'abdomen de la grenouille et du muscle de sangsue énervé ; il s'agit là de manifestations caractéristiques de l'activité nicotinique de l'acétylcholine.

Les auteurs se sont ingéniés à utiliser telle ou telle de ces propriétés pour effectuer un dosage biologique de l'acétylcholine. Nous passerons rapidement en revue ces différentes méthodes.

a) *Cœur de grenouille*. — Le cœur isolé de grenouille a été utilisé par de nombreux expérimentateurs pour caractériser l'acétylcholine, notamment par LOEWI (1921) pour montrer la présence du « Vagusstoff » dans le liquide de perfusion du cœur après excitation du vague.

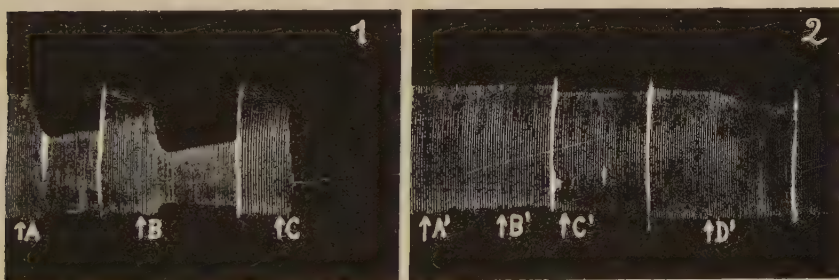
C'est au cœur de grenouille que recouraient HUNT et DE TAVEAU, dès 1906, pour doser la choline dans l'organisme après acétylation.

Nous décrirons ici la technique de Straub, la plus usuellement employée : sur une grenouille à cerveau et moelle détruits, le cœur est mis à nu, une canule de Fühner renfermant 1 à 2 centimètres-cubes de solution de Ringer est introduite par une aorte, poussée dans le ventricule lors d'une systole et fixée par une ligature. Après avoir lié les aortes et la veine cave, le cœur est isolé par section de ces vaisseaux et maintenu dans une chambre humide. On renouvelle la solution de Ringer jusqu'à ce que le liquide reste absolument clair, et les mouvements de l'organe sont transmis à un myographe très léger relié par un fil à la pointe du ventricule.

Le cœur de grenouille répond par une réaction inotrope négative dès que l'acétylcholine atteint une concentration de 1.10^{-9}

à 1.10^{-8} ; la sensibilité varie d'ailleurs assez largement suivant les préparations et peut être renforcée par le sulfate d'ésérine à la concentration de 1.10^{-4} (LOEWI et NAVRATIL, 1926) ; l'action inotrope de l'acétylcholine est surtout beaucoup plus prolongée, l'ésérine empêchant la destruction de cette substance par la cholinestérase du cœur. Cette méthode peut permettre une évaluation quantitative de l'acétylcholine avec une approximation de 10 à 20 p. 100.

Mais il faut tenir compte du fait qu'un très grand nombre de substances présentes dans les extraits de tissus, en particulier de petites quantités d'acide et les ions potassium produisent une action analogue à l'acétylcholine. CHANG et GADDUM (1933) ont signalé également une substance non identifiée qu'ils dénomment substance R et qui a sur le cœur de grenouille une action inotrope négative. D'autre part, les ions Ca et l'histamine (CLARK, 1913), (EGGLETON, 1926) ont une action inotrope positive. Cependant le fait que l'atropine supprime les effets de la choline et de ses esters permettra de les différencier des autres substances actives (*tracé 1*). Quant à la choline et à l'acétylcholine, l'action



Tracé 1. — Cœur de grenouille (technique de Straub).

1. — en A, acétylcholine 5.10^{-10} — en B, acétylcholine 1.10^{-9} — en C, acétylcholine 5.10^{-9} .

2. — après atropine 1.10^{-5} — en A', acétylcholine 1.10^{-7} — en B', acétylcholine 1.10^{-6} — en C', acétylcholine 1.10^{-5} — en D', acétylcholine 1.10^{-4} .

préalable de l'estérase sur un extrait permettra de les distinguer ; on pourra également dans ce cas avoir recours à l'action sensibilisatrice de l'ésérine sur le cœur vis-à-vis de la seule acétylcholine.

b) *Intestin isolé*. — GUGGENHEIM et LOFFLER (1916) ont utilisé l'intestin de cobaye pour le dosage de la choline après acétyl-

lation ; l'intestin de cobaye répond par une élévation du tonus à des concentrations d'acétylcholine de l'ordre de 1.10^{-9} . Certains auteurs utilisent l'intestin de lapin ou de rat (BERNHEIM, 1934) dont la sensibilité est légèrement inférieure. KAHLSON (1934) préconise l'utilisation de l'intestin de souris dont la sensibilité spécifique est, d'après cet auteur, plus grande que celle de l'intestin des autres animaux.

Nous donnons la technique généralement adoptée : dans un récipient renfermant 50 à 100 cm³ de Tyrode oxygéné et maintenu à 38° dans un thermostat, on plonge un fragment d'intestin de 2 à 3 cm. fixé au myographe de J. GAUTRELET ; on réalise une tension convenable à l'aide d'un cavalier de plomb placé sur le style du myographe et les mouvements pendulaires sont enregistrés sur un cylindre à vitesse lente.

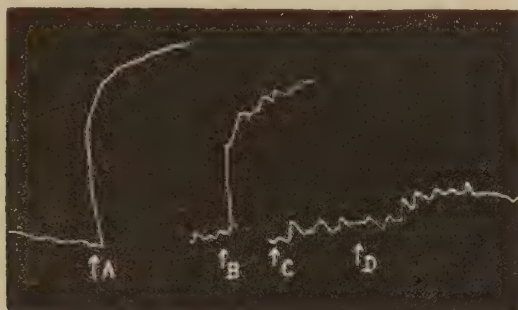
L'intestin isolé n'est pas un réactif spécifique de l'acétylcholine, il existe dans les extraits de tissus de nombreuses substances actives sur l'intestin, en particulier une substance P dont les propriétés ont été décrites par EULER et GADDUM (1931) et qui a une action stimulante sur l'intestin, mais à l'encontre de celui de l'acétylcholine cet effet n'est pas inhibé par l'atropine.

Nous remarquerons également que l'ésérine agissant elle-même en produisant une hausse du tonus de l'intestin, les extraits préalablement ésérinés ne pourront être dosés en utilisant ce test.

c) *Utérus isolé*. — FUHNER (1916) observe l'action contracturante de l'acétylcholine sur l'utérus de cobaye et WEBSTER (1935) préconise l'utérus de cobaye vierge pour le dosage de l'acétylcholine : une des cornes utérines est prélevée et fixée au myographe, à la manière de l'intestin isolé et maintenue à 37° dans un bain de Tyrode oxygéné. L'utérus répond par une contraction lorsque la concentration du bain en acétylcholine atteint 1.10^{-6} à 1.10^{-7} cet effet est inhibé par le sulfate d'atropine à concentration équivalente (*tracé 2*). Mais on doit remarquer que nombre de substances provoquent à concentration faible la contraction de l'utérus, en particulier l'histamine (2.10^{-7} à 1.10^{-8}) dont l'action est également supprimée par l'atropine (FELDBERG, 1933).

d) *Pression sanguine*. — HUNT et DE TAVEAU (1906) ont montré l'action très marquée de l'acétylcholine sur la pression

artérielle carotidienne ou fémorale. Cette action est 1.000 à 10.000 fois plus marquée que celle de la choline.



Tracé 2. — Utérus isolé de cobaye impubère.

en A, 0,5 cm³ d'acétylcholine à $1 \cdot 10^{-5}$ — en B, 0,3 cm³ d'acétylcholine à $1 \cdot 10^{-5}$ — en C, 0,5 cm³ d'atropine à $1 \cdot 10^{-5}$ — en D, 0,5 cm³ d'acétylcholine à $1 \cdot 10^{-5}$.

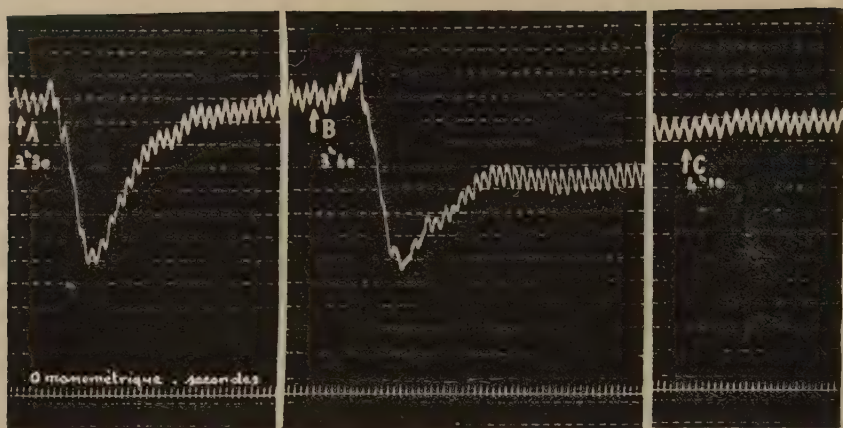
(Le volume du bain renfermant l'organe est de 50 cm³)

En injection intra-veineuse, l'acétylcholine produit une hypotension prolongée à la dose de 1/100 mgr. par kgr. chez le chien, chez le chat avec 2/1.000 et même 1/1.000 mgr. par kgr. et chez le lapin avec 5/100 mgr. par kgr. L'hypotension est encore accrue si l'on injecte préalablement à l'animal de petites doses d'ésérine.

La pression artérielle du chat (*tracé 3*) qui se montre particulièrement sensible à l'acétylcholine a été utilisée par divers auteurs pour caractériser de faibles doses d'acétylcholine extraites des milieux biologiques (DALE, 1914 ; HUNT, 1918).

EULER et GADDUM (1931) utilisent en même temps que les autres tests, l'action de l'acétylcholine sur la pression du lapin pour caractériser cette substance dans les extraits de tissus, mais ils doivent rapidement abandonner ce test par suite de l'existence dans les extraits de la substance P qui abaisse la pression.

Plus récemment Jeanne LÉVY et Laïa OLSZYCKA (1936) ont mis au point une méthode de dosage biologique de l'acétylcholine utilisant comme test l'action hypotensive de cette substance chez le chien. L'injection de sulfate d'ésérine (0,1 mgr.) chez l'animal augmente de 4 à 5 fois la sensibilité à l'acétylcholine. Ces auteurs observent l'action fugace mais très constante de très faibles doses d'acétylcholine et par cette méthode arrivent à caractériser des quantités de 0,05 à 1 γ de cette substance.



Trace 3. — Pression carotidienne du chat.

en A, injection intraveineuse de 0,25 γ p. kgr. de chlorure d'acétylcholine. — Après injection intraveineuse de 0,5 mgr. de sulfate d'ésérine, injection en B de 0,25 γ de chlorure d'acétylcholine. — Après injection de 1 mgr. p. kgr. de sulfate d'atropine, injection en C de 0,5 γ de chlorure d'acétylcholine.

e) *Gastrocnémien éterné de chat.* — FRANCK (1920), FRANCK NOTHMANN et HIRSCH-KAUFFMANN (1923), DALE et GASSER (1926) ont montré que les muscles de mammifères deviennent sensibles à l'acétylcholine après dégénérescence des nerfs moteurs.

Le sciatique du chat est sectionné aseptiquement une semaine avant l'utilisation. Le chat ainsi préparé est anesthésié au chloralose et soumis à la respiration artificielle. Les dernières artères lombaires et les branches inférieures de l'aorte sont liées excepté les deux artères iliaques externes. Le gastrocnémien est libéré, l'artère fémorale étant liée immédiatement au-dessous, et fixé à un myographe isométrique. Une solution de Ringer chaud arrose continuellement le muscle. L'ésérine (0,2 mgr.) est injectée dans la veine pour accroître la sensibilité et l'atropine (5 mgr.) est injectée par voie sous-cutanée pour abolir les effets vaso-moteurs de l'acétylcholine.

Les extraits dont on doit déterminer la teneur en acétylcholine ainsi que les solutions étalon sont injectés dans le bout central de l'artère iliaque externe de la patte normale, à l'aide d'une canule spéciale.

Dans ces conditions des doses de 0,1 à 0,2 γ d'acétylcholine produisent des réactions appréciables. Cette préparation est sensible et spécifique vis-à-vis de l'acétylcholine mais laborieuse.

f) *Cœur d'escargot*. — Nous avons nous-mêmes (N. HALPERN et E. CORTEGGIANI, 1935) utilisé le cœur d'escargot pour une étude comparative de la destruction estérasique de l'acétylcholine par divers organes de cobaye, de grenouille et d'escargot. La sensibilité du cœur isolé à l'acétylcholine est seulement de 1/20.000



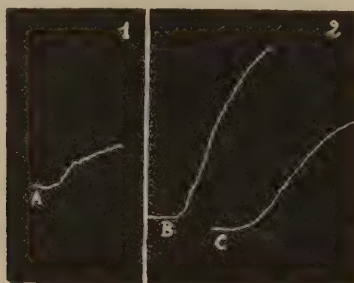
Tracé 4. — Cœur isolé d'escargot. *Hélix pomatia*.
en A, acétylcholine à 1/20.000.

et par suite ce test ne semble pas pouvoir être utilisé d'une manière générale pour doser l'acétylcholine dans les extraits de tissus (*tracé 4*).

g) *Muscle droit de l'abdomen de la grenouille*. — L'action contracturante de l'acétylcholine sur le muscle droit de l'abdomen de la grenouille a été signalée par RIESSER (1921). Cette action a été utilisée par CHANG et GADDUM pour caractériser et doser l'acétylcholine dans les extraits de tissus de divers animaux.

Le muscle *rectus abdominis* isolé de grenouille est fixé, à la manière de l'intestin isolé, à un myographe et plongé dans un bain de Ringer. Les doses utilisées pour le dosage sont légèrement supérieures à la dose seuil et laissées en contact avec la préparation pendant un temps bien déterminé (2 à 3 minutes). Les réponses dans ces conditions sont tout à fait constantes et permettent un dosage avec une approximation de 10 à 20 p. 100. Cette préparation est sensibilisée 4 à 5 fois par le sulfate d'ésé-

rine (1) à la concentration de 10^{-5} (*tracé 5*). Dans ces conditions la sensibilité à l'acétylcholine peut atteindre 1.10^{-7} pour le muscle *rectus abdominis* de *Rana esculenta*. Le muscle de *Rana temporaria* est légèrement moins sensible.



Tracé 5. — Muscle droit de l'abdomen de grenouille.

1. — en l'absence d'ésérine — en A, 10γ d'acétylcholine.
2. — en présence d'ésérine à la concentration de 1.10^{-5} — en B, 5γ d'acétylcholine — en C, 2γ d'acétylcholine.

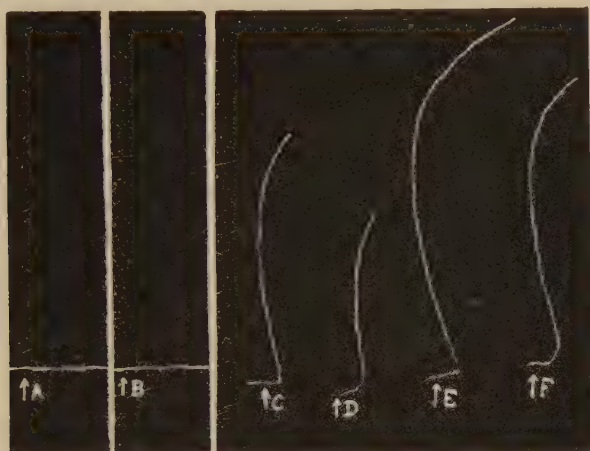
(Le volume du bain renfermant le muscle est de 50 cm^3).

Le potassium a une légère action contracturante, mais cette action est plus lente que celle de l'acétylcholine et souvent précédée d'un petit crochet. La choline n'agit qu'à des concentrations beaucoup plus élevées que l'acétylcholine (1.10^{-4}); de plus les actions du potassium et de la choline ne sont pas sensibilisées par l'ésérine. L'histamine, l'adénosine, le calcium et les substances P et R ajoutées même à fortes doses n'ont pas d'action sur la préparation.

h) *Muscle dorsal de sangsue.* — La très grande sensibilité du muscle de sangsue ésériné à l'acétylcholine a été observée pour la première fois par FUHNER (1918 a). En utilisant cette sensibilité exceptionnelle, MINZ (1932) a préconisé une technique de dosage biologique de l'acétylcholine. Nous-mêmes, dans ce travail, avons de préférence utilisé ce test qui présente de très grands avantages, tant par sa sensibilité que par sa spécificité vis-à-vis de l'acétylcholine ; le muscle dorsal ésériné de sangsue répond encore par une contraction à une concentration d'acétylcholine de 1.10^{-9} et même quelquefois 1.10^{-10} (*tracé 6*), alors qu'en l'absence d'ésérine il n'est sensible qu'à la concentration de 1.10^{-5} à 1.10^{-6} . Cette augmentation de sensibilité, qui, comme on

(1) L'ésérine est ajoutée chaque fois au bain car elle n'est pas très stable aux grandes dilutions sauf à pH acide.

le voit peut atteindre 10.000 fois la valeur normale, permettra une identification de l'acétylcholine ; en effet aucune substance en dehors de l'acétylcholine et de quelques esters de la choline (ces derniers n'ont d'ailleurs pas été jusqu'ici rencontrés dans les tissus animaux) n'est sensibilisée dans une telle proportion.



Tracé 6. — Muscle dorsal de sangsue. (1)

en A, 1 γ d'acétylcholine — en B, 1 cm^3 de sulfate d'ésérine à 1.10^{-4} . — Après 15 minutes, en C, 1 cm^3 d'ésérine à 1.10^{-4} + 0,5 γ d'acétylcholine. — en D, 1 cm^3 d'ésérine à 1.10^{-4} + 0,3 γ d'acétylcholine — en E, 1 cm^3 d'ésérine à 1.10^{-4} + 1 γ d'acétylcholine — en F, 1 cm^3 d'ésérine à 1.10^{-4} + 0,75 γ d'acétylcholine.

Nous donnerons ici la technique classique que nous avons utilisée pour les dosages d'acétylcholine dans les tissus.

1° TECHNIQUE.

Une sangsue médicinale (*Hirudo medicinalis*) de taille moyenne est fixée sur la face dorsale à une planchette de liège. Elle présente par suite sa face ventrale vert clair, ornementée de deux lignes longitudinales plus sombres ; on pratique une incision le long de chacune de ces lignes et le muscle ventral est ainsi séparé. La chaîne ganglionnaire est prélevée très soigneusement à l'aide d'une pince fine et l'intestin et les autres organes sont également enlevés. On sectionne la tête de l'animal, éliminant ainsi les ganglions cérébroïdes, qu'il serait particulièrement délicat d'arracher totalement. Seule la partie antérieure du muscle dorsal sera utilisée, KAHLSON et UVNAS (1935) ont en effet

(1) Tous les tracés relatifs au muscle de sangsue ont été réduits de 1/3.

signalé que la sensibilité de la partie antérieure était 4 fois plus grande que celle de la partie postérieure. Le lambeau de muscle ainsi préparé est fixé à la manière des organes isolés : la partie inférieure est attachée à un tube de verre permettant le passage de l'air ou de l'oxygène, l'autre extrémité est fixée au levier d'un myographe ; un cavalier de plomb placé sur le style inscripteur permet de réaliser une tension convenable et de faciliter la détente du muscle. Le muscle est plongé dans une éprouvette renfermant 50 centimètres-cubes d'une solution de Ringer et dont la partie inférieure peut communiquer, à l'aide d'un robinet à 3 voies, soit à un réservoir de 1 litre renfermant la solution de Ringer, soit à un tube de vidange. Ce dispositif permet les lavages rapides du muscle au cours des essais. Les contractions transmises au levier enregistreur s'inscrivent sur un cylindre à vitesse très lente (100 centimètres par heure).

Le muscle doit être préparé une heure environ avant de procéder aux dosages afin que son relâchement soit complet. Après lavage on ajoute alors au bain 1 centimètre-cube de sulfate d'ésérine à $1 \cdot 10^{-4}$. Il est à remarquer que, suivant les saisons, il est parfois nécessaire de modifier la concentration d'ésérine pour avoir le maximum de sensibilité ; cette concentration peut varier de $4 \cdot 10^{-6}$ à $1 \cdot 10^{-6}$. L'ésérine est laissée en contact pendant une vingtaine de minutes et, après lavage, le muscle peut être utilisé. Le dosage de l'acétylcholine dans l'extrait est obtenu par comparaison avec des solutions titrées d'acétylcholine (1). On procède tout d'abord à l'étalonnage de la sangsue : après addition aux 50 centimètres-cubes de Ringer, de 1 centimètre-cube d'ésérine $1 \cdot 10^{-4}$, on ajoute une dose d'acétylcholine (le plus souvent 0,5 γ) susceptible de provoquer une contraction nette mais non maximale ; on enregistre la contraction pendant 3 minutes exactement, puis on procède au lavage ; le muscle se détend assez rapidement (5 à 10 minutes) ; on répète 2 à 3 fois le même essai pour vérifier la constance de la réponse du muscle à une même dose d'acétylcholine. On fait agir pendant 3 minutes également l'extrait dans lequel on veut déceler l'acétylcholine (l'ésérine doit toujours être ajoutée immédiatement avant chaque essai et en

(1) Nous tenons à remercier les laboratoires Lematte et Boinot qui nous ont obligeamment fourni l'acécoline. Nous avons utilisé également le chlorure d'acétylcholine Hoffmann La Roche ; les solutions étalons étaient préparées au moment du dosage à partir d'une solution mère à 2 p. 1.000 acidifiée à pH = 4 et conservée à la glacière.

quantité telle que la concentration du bain en cette substance soit constante ; il faudra naturellement tenir compte de l'ésérine contenue éventuellement dans les extraits). Après lavage, si la courbe obtenue n'est pas maximale, il sera facile de rechercher la dose de solution étalon nécessaire pour obtenir une courbe identique. Dans ces conditions le dosage peut être réalisé avec une approximation de 10 à 20 p. 100.

Nous avons opéré à la température du laboratoire variant de 18 à 23° ; ces modifications sont d'ailleurs sans influence aussi bien sur le tonus propre du muscle (TESCHENDORF, 1921) que sur sa sensibilité à l'acétylcholine (DODEL et DASTUGUE, 1937).

SOLUTIONS. — Nous avons utilisé la solution de Ringer pour grenouille. *Formule* : Chlorure de sodium = 6,5 gr. ; Chlorure de Potassium = 0,14 gr. ; Chlorure de calcium cristallisé = 0,12 gr. ; Bicarbonate de sodium = 0,20 gr. ; Eau q. s. = 1.000 gr. Le pH de cette solution est voisin de 7.

Nous avons remarqué des modifications importantes de la sensibilité du muscle de sangsue à l'acétylcholine lorsque la concentration de certains sels varie. Signalons la sensibilisation importante du muscle de sangsue ésériné vis-à-vis de l'acétylcholine par augmentation de la concentration en chlorure de sodium du bain ; si cette concentration passe de 6,5 p. 1.000 à 9 p. 1.000 nous avons déjà remarqué une légère sensibilisation du muscle de sangsue à l'acétylcholine. C'est sans doute pour cette raison qu'il a été préconisé une solution beaucoup plus riche en chlorure de sodium (LANARI, 1936, p. 19). *Formule* : chlorure de sodium = 12 gr. ; chlorure de calcium = 0,20 gr. ; chlorure de potassium = 0,15 gr. ; bicarbonate de sodium = 0,20 gr. ; eau q. s. = 1.000 gr. Nous n'avons pas adopté cette solution pour les dosages d'acétylcholine, car si le muscle est en effet très sensible à l'acétylcholine au début de l'expérience, cette sensibilité est peu stable, elle décroît rapidement et par suite ne permet pas un dosage précis.

Par contre le chlorure de potassium, qui à la concentration de 2.10^{-4} à 1.10^{-3} est généralement sans aucune action sur le muscle de sangsue ésériné, (nous avons cependant observé parfois un léger relâchement, signalé par ailleurs par CHANG et GADDUM [1933]) diminue de manière très nette la sensibilité à l'acétylcholine du muscle ésériné. Après addition de 1 centimètre-cube de chlorure de potassium à 9 p. 1.000 aux 50 centimètres-

cubes de Ringer éseriné renfermant le muscle de sangsue, la sensibilité du muscle à l'acétylcholine a diminué de moitié ; d'ailleurs, après plusieurs lavages de la sangsue, la sensibilité normale réapparaît. Rappelons que GOLLWITZER-MEIER et KRUEGER (1934) avaient déjà signalé que le potassium libéré au cours de l'hémolyse était capable d'empêcher l'action sur le muscle de sangsue de l'acétylcholine contenue dans le sang.

2° SPECIFICITE D'ACTION DE L'ACETYLCHOLINE.

A part ces modifications de sensibilité vis-à-vis de l'acétylcholine, dont il faudra tenir compte pour le dosage de cette substance, le muscle de sangsue est de tous les tests précédemment étudiés le plus spécifique pour l'acétylcholine. Il réagit cependant à de nombreuses substances, mais à des doses beaucoup plus élevées par rapport à la dose active d'acétylcholine ; d'ailleurs, l'action de l'estérase permettra de les différencier de l'acétylcholine. CHANG et GADDUM (1933) ont signalé que les substances indéterminées P et R, rencontrées dans les extraits de tissus, sont sans action sur le muscle de sangsue.

Depuis FUHNER, nombre d'auteurs ont étudié les facteurs, tant physiques que chimiques, agissant sur le muscle de sangsue. TESCHENDORF (1921) a montré que ce muscle était généralement peu affecté par les changements de pression osmotique et par les variations de température. Cet auteur étudie également l'influence de certains anions et cations : tandis que NO_3^- , I^- , SCN^- augmentent le tonus, Cl^- , Br^- , PO_4^{--} , ClO_3^- sont sans action. L'insuffisance de Na^+ élève le tonus ; le K^+ à fortes concentrations, NH_4^+ , Ba^{++} augmentent le tonus ; le Mg^{++} l'abaisse et le Ca^{++} est sans action.

MINZ (1932) établit qu'une concentration de choline à 1/10.000 est nécessaire pour provoquer la contraction du muscle, l'histamine et la peptone sont sans action, de même que l'adrénaline ; la neurine provoque une contraction à 1/20.000 ; l'atropine agit à forte concentration (1/2.000) en provoquant une légère contracture.

Th. FONTAINE (1935) a étudié sur le muscle de sangsue l'action de divers poisons musculaires et de différentes substances biologiques, et précisé les doses actives. Cet auteur insiste particulièrement sur l'action excitante des poisons musculaires,

vératrine, spartéine, iodure de tétraméthylammonium, triméthylamine, iodométhylate d'urotropine, etc....

Enfin plus récemment DODEL et DASTUGUE (1937) ont fait une étude pharmacodynamique très complète du muscle de sangsue.

Si nous nous reportons à ces divers travaux, nous sommes d'autant plus frappés par la spécificité d'action de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue. Après l'acétylcholine qui agit à la concentration de $1/10^9$ à $1/10^{10}$, la nicotine est la substance la plus active et n'agit qu'à $1/2.10^5$.

3° MÉCANISME DE SENSIBILISATION DU MUSCLE DE SANGSUE PAR L'ÉSÉRINE VIS-A-VIS DE L'ACÉTYLCHOLINE.

Notre attention a été particulièrement attirée par la sensibilisation particulièrement intense du muscle de sangsue par l'ésérine vis-à-vis de l'acétylcholine. Depuis FÜHNER, qui la mettait en évidence dès 1918, de nombreux auteurs ont cherché à expliquer le mécanisme de cette sensibilisation. D'une manière générale, chez les mammifères en particulier, l'ésérine agit en entravant la destruction de l'acétylcholine. Peut-on invoquer pour le muscle de sangsue un mécanisme analogue, ou bien l'ésérine exerce-t-elle une sensibilisation véritable, soit par augmentation de la sensibilité des terminaisons nerveuses, soit en agissant sur le muscle lui-même ? Nous discuterons rapidement ces deux points de vue sur lesquels il nous a été donné d'apporter quelques documents personnels (J. GAUTRELET, E. CORTEGGIANI, A. KASWIN et A. SERFATY, 1936).

— *L'ésérine agit en inhibant la cholinestérase du muscle de sangsue.* — Tout d'abord le muscle de sangsue renferme-t-il de la cholinestérase et dans quelles proportions ? L'acétylcholine à la concentration de $1/10^3$ n'ayant aucune action sur le muscle de sangsue non ésériné, nous devons nous attendre à trouver pour le muscle de sangsue un pouvoir cholinestérasique très marqué. La présence d'estérase a été d'ailleurs signalée par quelques auteurs, KAHLSON et UYNAS (1935) en particulier. Nous-mêmes avons comparé l'activité cholinestérasique du muscle de sangsue à celle de divers extraits de tissus d'animaux. Mais si le pouvoir estérasique du muscle de sangsue est relativement grand lorsque le muscle est broyé, il n'en est pas de même avec le muscle intact. Dans ces conditions, si l'on ajoute au bain de Ringer (50 centi-

mètres-cubes), renfermant le muscle de sangsue, 10 γ d'acétylcholine, nous n'obtenons après 25 minutes qu'une destruction de 50 p. 100 de cette substance. Ce fait a d'ailleurs été vérifié par E. KAHANE et J. LÉVY (1937 a). Ces auteurs admettent que ce n'est pas en protégeant l'acétylcholine du bain contre l'estérase susceptible de diffuser du muscle de sangsue que se manifeste l'action de l'ésérine, mais en inhibant les estérases tissulaires et en permettant à l'acétylcholine qui pénètre d'atteindre à une concentration suffisante les cellules sensibles.

D'autre part, si la sensibilisation par l'ésérine est due à la seule action anticholinestérasique de cette substance, il doit exister un rapport constant entre le coefficient d'hydrolyse et le coefficient de sensibilisation des divers esters de la choline ; cette étude a été faite par E. KAHANE et J. LÉVY (1937 b) et ces auteurs ont bien montré qu'il existe un certain parallélisme entre l'hydrolyse par les extraits de muscle de sangsue de ces divers esters et la sensibilisation de leur action par l'ésérine sur le muscle dorsal énnervé, mais on doit remarquer que ce parallélisme est loin d'être absolu.

Par ailleurs, on sait qu'il existe un grand nombre de substances susceptibles d'inhiber la cholinestérase. Citons l'ergotamine (LOEWI et NAVRATIL, 1926) divers narcotiques (PLATTNER et GALEHR, 1928), la quinine, les fluorures, l'atoxyl (PLATTNER et HINTNER, 1930), la nicotine (MATTHES, 1930), la muscarine, la prostigmine (AMMON, 1933), un grand nombre d'uréthanes synthétiques (STEDMAN E. et E., 1931-1932), l'aldéhyde formique (E. CORTEGGIANI, GAUTRELET, HALPERN et SERFATY, 1936), la génésérine, l'éphédrine, l'antipyrine, la choline (KAHANE et J. LÉVY, 1936 c), l'histamine (BAYER et WENSE, 1936 b), etc.

Ces substances sont-elles capables de sensibiliser à un degré plus ou moins grand le muscle de sangsue vis-à-vis de l'acétylcholine ? MINZ (1932) a signalé l'hypersensibilité du muscle de sangsue sous l'influence de la choline, le même fait a été observé pour l'histamine (BAYER et WENSE, 1936 b). De même, si E. KAHANE et J. LÉVY (1937 c) constatent la sensibilisation du muscle par la génésérine, l'éphédrine, l'antipyrine, la choline, ces auteurs remarquent le faible coefficient de sensibilisation, par rapport à celui de l'ésérine, de ces divers inhibiteurs de la cholinestérase, à des doses où ils inhibent la diastase au même degré que l'ésérine. Dans le même sens, KAHLSON et UVNAS (1935),

après avoir vérifié l'action inhibitrice des fluorures sur l'estérase du muscle de sangsue, montrent que ces substances n'ont aucune action sensibilisatrice sur ce muscle vis-à-vis de l'acétylcholine. Ces auteurs étudient également le rapport entre la sensibilisation des divers tests par l'ésérine (muscle *rectus abdominis* et gastrocnemium de grenouille et muscle de sangsue) et leur pouvoir anticholinestérasique ; le muscle de sangsue, bien qu'étant sensibilisé 1.000 fois plus que les deux autres tests par l'ésérine, possède seulement un pouvoir estérasique 20 à 30 fois plus grand. Quant au m. *rectus* et au gastrocnémien de grenouille, dont les activités cholinestérasiques sont semblables, de ces deux tests, un seul, le m. *rectus*, est sensibilisé par l'ésérine.

Toutes ces dernières observations rendent difficile, dans le mécanisme de sensibilisation, une simple intervention de l'ésérine par blocage de la cholinestérase.

Signalons encore que plus récemment EMMELIN et KAHLSON (1937) observent la sensibilisation du muscle de sangsue par la créatinine (1/10.000), le cardiazol (1/5.000 à 1/10.000), la coramine (1/1.000 à 1/5.000), substances dont à notre connaissance n'a pas été signalé l'action anticholinestérasique.

Quoi qu'il en soit, il semble que si l'ésérine renforce et prolonge indubitablement l'action de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue par inhibition de la cholinestérase, ceci ne peut suffire à expliquer la sensibilisation si particulièrement intense de ce test à l'égard de l'acétylcholine.

— *L'ésérine agit par hypersensibilité cellulaire vis-à-vis de l'acétylcholine.* — FUHNER (1918 c) supposait qu'il s'agissait de l'augmentation de la sensibilité du muscle lui-même ; il ne pouvait faire intervenir le rôle de la cholinestérase dont l'existence était alors ignorée. FUHNER signalait, en outre de l'action de l'ésérine à la concentration de 1.10^{-6} vis-à-vis de l'acétylcholine, une action également sensibilisante de l'ésérine à l'égard du chlorure de Baryum (2.10^{-6}), de la nicotine (1.10^{-6}) et plus faiblement à l'égard de la muscarine. Par la suite, MINZ (1932) constate la sensibilisation de la neurine ; nous avons vérifié ces faits et nous avons observé qu'il en était de même à l'égard de la Bétaïne (1.10^{-4}).

Il paraît utile d'insister sur le fait que ces diverses substances, à part l'acétylcholine, ne sont pas touchées par l'estérase. Le même argument est valable à l'endroit de la vératrine et du po-

tassium. Or, nous avons constaté qu'à la concentration de 1.10^{-5} et 5.10^{-4} ces substances provoquent une succession de petites contractions que l'addition préalable d'ésérine au liquide de Ringer transforme en une véritable contracture (*tracé 7*). Enfin,



Tracé 7. — Muscle dorsal de sangsue.

1. Muscle non ésériné. — en A, 1 cm^3 de sulfate de vératrine à 2.10^{-4} .
2. Muscle ésériné. — en B, 1 cm^3 de sulfate de vératrine à 2.10^{-4} .

l'ésérine, au reste, est susceptible de provoquer par elle-même l'excitation du muscle de sangsue, il suffit d'opérer à dose convenable, comme le montrent nos propres expériences après celles de FUHNER.

En résumé, s'il convient d'attribuer à l'ésérine, dans le mécanisme de sensibilisation vis-à-vis de l'acétylcholine, une part à l'inhibition de la cholinestérase, il y a lieu d'affirmer que l'ésérine est douée, d'une manière générale, d'une action sensibilisante propre sur le muscle de sangsue.

CHAPITRE II

L'acétylcholine dans les tissus **Etat dissimulé de l'acétylcholine**

§ 1. — Acétylcholine dans le sang et les organes

En 1914, EWINS montra l'existence de l'acétylcholine dans l'ergot de seigle, parasite de cette plante, et pendant longtemps il fut admis que l'acétylcholine était une substance ne se rencontrant que chez les champignons. Ce n'est qu'à la suite des expériences de LOEWI (1921), qui dès 1922 compara l'action du « Vagusstoff » à celle de l'acétylcholine, que l'on commença à songer à la possibilité de l'existence de cette substance dans les tissus des Vertébrés. En 1925, WITANOWSKI caractérise l'acétylcholine dans un extrait alcoolique de cœur de grenouille, enfin en 1929 l'acétylcholine, chimiquement pure, est isolée sous forme de chloroplatinate double de choline et d'acétylcholine par DALE et DUDLEY, à partir d'un extrait de rate de cheval. Depuis cette date, de nombreux auteurs se sont attachés à la recherche de l'acétylcholine dans le sang, les organes et les tissus animaux. Citons parmi les travaux les plus importants ceux de KAPFHAMMER et BISCHOFF (1930), BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER (1931-1932) sur la présence de grandes quantités d'acétylcholine principalement dans le sang, le foie, le pancréas et les surrénales de bœuf, de CHANG et GADDUM (1933) caractérisant cette substance dans nombre d'organes de divers animaux et ceux de PLATTNER (1934), PLATTNER et TSUDZIMURA (1935), GOLLWITZER-MEIER (1934) pour nous limiter aux Vertébrés.

Une mise au point a été faite par J. GAUTRELET (1936) et nous nous reporterons à ce travail comme base pour établir le tableau I donnant les quantités d'acétylcholine trouvées dans les organes des Vertébrés.

TABLEAU 1

*Indiquant la teneur en Acétylcholine des organes
de divers animaux*

Organe	Animal	Acétylcholine en γ par gr.	Références
Foie	Chien	0	Strack, Neubauer et Geissendorfer (1933)
	»	0,11	Chang et Gaddum (1933)
	Bœuf	84	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)
	»	0	Strack, Neubauer et Geissendorfer (1933)
	Chat	0,02	Plattner (1934)
Pancréas	»	0,09	Plattner et Tsudzimura (1935)
	Bœuf	152	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)
	Cheval	0,6	Chang et Gaddum (1933)
	Chien	0,13 — 0,22	Chang et Gaddum (1933)
	Chat	1,2	Plattner et Tsudzimura (1935)
Rate	Chien	0	Chang et Gaddum (1933)
	»	0	Gollwitzer-Meier et Krueger (1934)
	Cheval	4 — 30	Chang et Gaddum (1933)
	»	5 — 30	Dale et Dudley (1929)
	Bœuf	38	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)
	»	1 — 4	Gollwitzer-Meier et Krueger (1934)
	»	+	Best, Dale, Dudley et Thorpe (1927)
	»	3 — 48	Kahlson (1934)
	Chat	0	Plattner et Tsudzimura (1935)
	»	+	Tremonti (1934)
	»	0	Kahlson (1934)
	»	0	Gollwitzer-Meier et Krueger (1934)
	»	0,2 — 0,4	Plattner (1934)
	Lapin	0	Kahlson (1934)
	Porc	0	Kahlson (1934)
Rein	Chien	0	Chang et Gaddum (1933)
	Bœuf	68 — 82	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)
	»	0,06	Plattner et Tsudzimura (1935)
Vessie	Chien	1,2	Chang et Gaddum (1933)
	Chat	2,3 — 2,8	Plattner et Tsudzimura (1935)
Estomac	Chien	0,7	Chang et Gaddum (1933)
	Lapin	1,1 — 1,3	Chang et Gaddum (1933)
	Chat	1,2 — 1,3	Plattner et Tsudzimura (1935)
Intestin	Bœuf (duod.)	45	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)
	Cheval (I grêle)	1,8 — 2	Chang et Gaddum (1933)
	Chien (d ^e)	1,7 — 2,6	»
	» (gros int.)	2	»
	Lapin (I grêle)	2,8 — 4	»
	Lapin	0,5 — 6	Kahlson (1934)
	Chat (colon)	1,4 — 1,7	Plattner et Tsudzimura (1935)
	» (jejunum)	1,4 — 1,5	»
	Cobaye	0,5 — 6	Kahlson (1934)
	Chien	1 — 3,3	Chang et Gaddum (1933)
Gl. sous-maxillaire	Chat	2,8 — 3	Plattner et Tsudzimura (1935)
Glande parotide	Chat	0,9	Chang et Gaddum (1933)
	»	0,8 — 0,9	Plattner et Tsudzimura (1935)
Salive	Chat	+	Larson (1935)
Œsophage	Chat	0,4	Chang et Gaddum (1933)
Surrénale	Cheval	0,4 — 0,6	Chang et Gaddum (1933)
	Bœuf (médul.)	215	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)
	»	0,7	Feldberg et Schild (1934)
	» (cort.)	0,2	»
	Chat	1,2 — 1,4	Plattner et Tsudzimura (1935)
	»	0,3 — 0,7	Plattner (1934)
	Chien	0,33	»

Organe	Animal	Acétylcholine en γ par gr.	Références	
Thymus	Bœuf	109 — 112	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)	
Hypophyse	Chat	0,8 — 2	Plattner (1934)	
Thyroïde	Chat	0 (< 0,25)	Plattner et Tsudzimura (1935)	
Testicule	Chien	0 (< 0,1)	Chang et Gaddum (1933)	
	Chat	0,3	Plattner et Tsudzimura (1935)	
Placenta	Femme	15 — 133	Chang et Wöng (1933)	
	»	74 — 459	Hauptstein (1932)	
	»	6 — 87	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)	
	Vache (mat.)	71 — 100	» » »	
	» (fœtal)	38 — 76	» » »	
	Lapine	0	Chang et Gaddum (1933)	
Utérus	Vache (grav.)	0	Bischoff, Graf et Kapfhammer (1932)	
	Lapine	0,4	Chang et Gaddum (1933)	
	Chat	0,3 — 0,9	Plattner et Tsudzimura (1935)	
Lait	Vache	14 — 38	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)	
	Chat	0	Plattner et Tsudzimura (1935)	
Cœur	Bœuf	23 — 32	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)	
	Chien (or.)	0,9 — 1,9	Chang et Gaddum (1933)	
	» vent.	0,1 — 0,35	» »	
	Lapin (or.)	4	Engelhardt (1930)	
	» (vent.)	0,13	»	
	Chat	0,6	Plattner et Tsudzimura (1935)	
	Grenouille	+	Beznak (1934)	
Poumons	Bœuf	101	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)	
	Chien	0,13	Chang et Gaddum (1933)	
	Chat	0,5 — 0,6	Plattner et Tsudzimura (1935)	
Trachée	Chien	0,2	Chang et Gaddum (1933)	
Diaphragme	Chien	0 (< 0,1)	Chang et Gaddum (1933)	
Muscles squelettiques	Bœuf	194	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1932)	
	Cheval	0,06 — 0,08	Chang et Gaddum (1933)	
	Lapin	0,06	» »	
	Grenouille	+	Plattner et Krannich (1932)	
	»	0,08	Chang et Gaddum (1933)	
Peau	Lapin	0,1	Chang et Gaddum (1933)	
	Chien	0,4	Chang et Gaddum (1933)	
Cerveau	Chien	1,5 — 3,8	Kwiatkowski (1935)	
	Chat	0,5 — 4	Dikshit (1933-1934)	
	»	0,4 — 2	Kwiatkowski (1935)	
	»	1,7 — 4,2	Plattner (1934)	
	»	0,7 — 1,3	Plattner et Tsudzimura (1935)	

Organe	Animal	Acétylcholine en γ par gr.	Références
Chaîne sympathique	Cheval	1,3 — 3,9	Chang et Gaddum (1933)
Gl. lacrymale	Chien	1,35	Plattner (1934)
	Chat	3,4 — 4	Plattner et Tsudzimura (1935)
Sang	Homme	0,1 — 20	Kahane et J. Lévy (1937 d)
	Monton	0,1 — 0,6	»
	Porc	0,1 — 1,4	»
	Veau	0,16 — 0,2	»
	Bœuf	0	Gollwitzer-Meier (1934)
	»	0	Wrede et Keil (1931)
	»	0	Loach (1934)
	»	faibles doses	Ettinger et Hall (1934)
	»	+	Vogelfanger (1933)
	»	0,06 — 0,08	Chang et Gaddum (1933)
	»	20	Kapfhammer et Bischoff (1931)
	»	14 — 39	Bischoff, Grab et Kapfhammer (1931)
	»	0,15 — 8	Kahane et J. Lévy (1937 d)
	»	0	Kahlson et Roemer (1934)
	»	0	Dudley (1933)
	Cheval	0,05 — 0,06	Chang et Gaddum (1933)
	»	0,16 — 1,6	Kahane et J. Lévy (1937 d)
	Lapin	+	Zipf et Wagenfeld (1930)
	»	0,4 — 6	Kahane et J. Lévy (1937 d)
	Chien	0	Feldberg et Rosenfeld (1933)
	»	faibles doses	Ettinger et Hall (1934)
	»	+	Donomæ (1934)
	»	0,05	Chang et Gaddum (1933)
	»	0,1 — 8	Kahane et J. Lévy (1937 d)
	Cobaye	0,1 — 6,4	»
	Rat	0,4 — 1,6	»
	Souris	1,5	»
Liquide céphalo- rachidien	Chat	+	Dikshit (1933)
	»	0,3	Plattner et Tsudzimura (1935)
	»	+	Feldberg et Schriever (1936)

De l'examen de ce tableau, il ressort, qu'à l'heure actuelle, l'acétylcholine peut être considérée comme un constituant normal des tissus animaux. Cependant il est difficile d'admettre que cette substance dont l'action physiologique est particulièrement intense puisse exister à l'état libre dans le sang et les organes aux doses parfois très importantes signalées par les auteurs. De plus, si l'acétylcholine existait sous une forme diffusible, elle serait immédiatement détruite par l'estérase renfermée normalement dans les tissus. CHANG et GADDUM (1933) font remarquer en effet, d'après les dosages de cholinestérase réalisés par PLATTNER et HINTNER (1930) dans les tissus de divers animaux, que la distribution de l'acétylcholine est en rapport avec celle de la diastase et que, si quelques organes échappent à cette règle, il n'existe du moins aucun tissu riche en acétylcholine et pauvre en estérase. PLATTNER et TSUDZIMURA (1935) nient pourtant tout rapport entre l'activité estérasique et la teneur en acétylcholine des tissus; ce fait est en désaccord avec les récents travaux de NACHMANSOHN

(1937, 1938 a, b) montrant en particulier dans les différentes régions du cerveau un parallélisme très net entre l'activité cholinestérasique et le taux de l'acétylcholine. Ajoutons encore un très récent travail de VINCENT et JULLIEN (1938, b, c) signalant un fait analogue dans les extraits myocardiques et l'hémolymphe de divers mollusques.

§ 2. — Origine de l'acétylcholine

Dès que fut précisé le rôle de l'acétylcholine dans l'organisme, les auteurs se sont posé la question de l'origine de cette substance. Deux hypothèses ont été envisagées : la formation directe de l'acétylcholine par synthèse ou la libération de celle-ci à partir d'une substance inactive à laquelle elle serait combinée.

a) *Formation par synthèse directe.* — LE HEUX (1921) constate que les sels d'acides organiques et en particulier l'acétate de sodium excitent l'intestin isolé de mammifère ; cet effet disparaît lorsque la choline de l'intestin a été éliminée par plusieurs lavages. Cet auteur fait l'hypothèse de l'existence dans la paroi de l'organe d'un ferment capable d'estérifier la choline avec les acides gras. Dans le même sens ABDERHALDEN, PAFFRATH et SICKEL (1925) constatent l'apparition d'acétylcholine par addition de chlorure de choline et d'acétaldéhyde à une macération intestinale. AMMON et KWIATKOWSKI (1934) précisent la nature fermentaire de la synthèse de l'acétylcholine à partir de l'acétate de sodium, de l'acide acétique et du chlorhydrate de choline en présence de sérum frais, et, constatant que la réaction n'a pas lieu en présence d'ésérine, invoquent l'intervention probable de la cholinestérase. Enfin, STRACK, NEUBAUER et GESSENDORFER (1933) émettent l'hypothèse de la formation de l'acétylcholine par estérification à partir des phosphatides et de la choline.

b) *Existence d'une forme dissimulée de l'acétylcholine.* — Si une synthèse de l'acétylcholine est sans aucun doute à envisager, l'acétylcholine libérée en une décharge brusque lors de l'excitation nerveuse peut difficilement voir son origine expliquée par un tel mécanisme. Beaucoup plus séduisante est l'hypothèse d'une libération de cette substance à partir d'un stock préformé où l'acétylcholine existerait sous forme inactive. Cette manière de voir a l'avantage d'expliquer la possibilité de l'existence de fortes doses d'acétylcholine dans les organes ; peut-être faut-il voir là également l'explication des divergences entre les résul-

tats des dosages effectués par les auteurs dans le sang notamment.

1° *Acétylcholine dissimulée dans le sang.* — Si en effet BISCHOFF, GRAB et KAPFHAMMER (1931), VOGELFANGER (1933), ETTINGER et HALL (1934) décèlent des quantités plus ou moins élevées d'acétylcholine dans le sang de bœuf, par contre, WREDE et KEIL (1931), DALE et DUDLEY (1933), KAHLSON et ROMER (1934) n'en trouvent pas. Les écarts parfois considérables entre les chiffres trouvés par les divers auteurs ne peuvent s'expliquer que par l'hypothèse de l'existence d'un complexe renfermant l'acétylcholine sous une forme inactive (KAHANE, 1934).

Depuis lors, E. KAHANE et J. LÉVY (1936, a) mettent en évidence dans le sang une forme dissimulée de l'acétylcholine liée à un constituant non ultrafiltrable, celle-ci pouvant être libérée par traitement du sang par l'eau bouillante ; enfin KAHANE (1937) émet l'hypothèse de l'intervention de l'acide orthoacétique dans la genèse d'un complexe acétylcholinique, deux fonctions oxhydrides libres permettant une liaison avec un support protéinique en particulier.

On doit remarquer que les auteurs ont procédé en général à des extractions chimiques, et on peut se demander si, au cours du traitement, il n'y a pas libération d'une acétylcholine active à partir d'un complexe, cette libération pouvant être plus ou moins grande suivant la technique adoptée. Les travaux de E. KAHANE et J. LÉVY (1937, d) tendent à prouver qu'il en est bien ainsi ; ces auteurs observent le fait très curieux qu'en opérant sur de petites quantités de sang (quelques centimètres-cubes), les quantités d'acétylcholine trouvées sont beaucoup plus grande que si l'on opère sur plusieurs litres. Rappelons également que GOLLWITZER-MEIER (1934) montre la libération de l'acétylcholine du sang au cours de l'hémolyse et que BROUN et SCHEINER (1936) libèrent par alcalinisation l'acétylcholine fixé à un complexe non ultrafiltrable du sérum.

Enfin, dans un très récent travail, BLUM (1938) montre qu'il n'existe pas d'acétylcholine à l'état libre dans le sang normal, mais que cette substance peut apparaître après le travail musculaire ou après la mort de l'animal, fait d'ailleurs antérieurement signalé par FRANEL (1935) et FLEISCH-SIBUL et KAELIN (1936).

Nous n'entrerons pas plus avant dans la discussion de ces travaux. Il semble en définitive que la présence d'une forme complexe de l'acétylcholine dans le sang soit généralement ad-

mise, mais aucune hypothèse ne peut encore être faite sur la nature de ce complexe.

2° *Acétylcholine dissimulée dans les organes.* — S'il existe de nombreux travaux relatifs à l'étude d'un complexe acétylcholinique dans le sang, peu d'auteurs se sont attachés à sa recherche dans les organes. GOLLWITZER-MEIER (1934) a montré l'augmentation de l'acétylcholine extractible de la rate de bœuf après congélation de l'organe, et BEZNAK (1934) a émis l'hypothèse de l'existence dans le cœur de grenouille d'un précurseur labile inactif de l'acétylcholine, susceptible de libérer cette substance par action de l'alcool sur le jus de presse de l'organe. Mais on ne saurait mettre sur le même plan les expériences de CHANG (1935, a, b) et CHANG WEN et WONG (1935) sur le placenta ; sans doute ces auteurs observent-ils que l'extrait salin de placenta humain éseriné présente une activité acétylcholinique sur le muscle *rectus abdominis* de grenouille plus faible que celle de l'extrait alcoolique, mais cette différence paraît relever à leur yeux du fait que le blocage de la cholinestérase par l'éserine est inférieur à celui qu'exerce l'alcool, et en définitive ils considèrent, qu'après extraction par l'alcool aussi bien que par le liquide physiologique, on se trouve en présence de l'acétylcholine « libre » ; ce n'est qu'après chauffage du placenta à 37° et pendant 3 à 4 heures que l'on peut révéler la présence d'un excès d'acétylcholine qui est susceptible d'être mis sur le compte de la libération d'une acétylcholine de « réserve ». Nous insisterons sur le fait que cette acétylcholine n'est mise en liberté qu'après une autolyse de l'organe d'une certaine durée, condition au reste analogue à celles dans lesquelles il nous a été donné de réaliser, avec J. GAUTRELET, A. KASWIN et C. MENTZER (1936), la libération d'acétylcholine dans le foie du cobaye et que nous exposerons, pour mémoire, rapidement.

Le foie de cobaye étant prélevé dans l'eau éserinée (2 cm³ de sulfate d'éserine à 1/20.000 pour 3 grs. d'organe), le broyage était fait immédiatement et 2 grs. d'organe ajoutés sur le muscle de sangsue éseriné ne produisaient, le plus souvent, qu'une très faible contraction. Par contre, 1 h. 1/2 après broyage la même dose d'extrait provoquait une forte contraction, celle-ci correspondant en moyenne à 0,3 γ d'acétylcholine par gr. de foie ; la quantité de substance active libérée était essentiellement fonction du temps, cependant, le maximum était atteint au bout de 2 heures. Nous avons tenté de préciser le mécanisme de cette libération

et nous nous sommes demandés s'il ne s'agissait pas d'un phénomène diastasique. Si le foie est soumis à une température de 60 à 100° immédiatement après prélèvement, on ne peut mettre en évidence après 1 à 2 heures aucune activité acétylcholinique ; si l'on compare également les extraits conservés à la glacière et ceux maintenus à 38° pendant le même temps, la libération est toujours plus importante dans l'extrait à 38° ; au reste un optimum de température nous est apparu vers 40°. Ces observations semblent nettement en faveur d'un mécanisme diastasique.

Il convient de rapprocher de ces diverses données les expériences récentes d'après lesquelles QUASTEL, TENNENBAUM et WHEATLEY (1936) et STEDMAN E. et E. (1937) mettent en évidence la libération importante d'acétylcholine du cerveau à 37° en fonction du temps ; nous aurons d'ailleurs l'occasion de revenir ultérieurement sur ces derniers faits. Enfin, JULLIEN, VINCENT, BOUCHET et VUILLET (1938) observent également la libération d'acétylcholine du cœur de quelques invertébrés en fonction du temps.

Tout autrement se présente le problème de l'existence d'un complexe acétylcholinique, tel que nous l'avons mis en évidence dès 1936 avec J. GAUTRELET, A. KASWIN et C. MENTZER, dans la suspension aqueuse de cerveau frais, susceptible de libérer immédiatement sous l'influence de la chaleur ou de l'alcool une certaine quantité d'acétylcholine jusqu'alors dissimulée. Il s'agit là du reste de l'essentiel de nos propres recherches, que nous allons développer dans les chapitres suivants.

En résumé, l'acétylcholine existe dans la plupart des organes, comme il ressort de l'inventaire effectué par les divers auteurs. L'existence d'une forme dissimulée a été envisagée par certains d'entre eux en particulier dans le sang. Nous rappelons à ce propos les expériences qui nous ont par ailleurs permis de mettre en évidence la libération d'acétylcholine du foie de cobaye autolysé, la quantité libérée étant essentiellement fonction du temps ; si dans ce cas l'existence d'un complexe acétylcholinique préformé ne s'impose pas, il en est tout autrement dans les expériences qui vont faire l'objet de notre travail, où il nous sera donné de mettre en évidence, dans certaines conditions, la libération immédiate d'une acétylcholine existant sous une forme dissimulée dans le cerveau.

CHAPITRE III

L'acétylcholine dans le cerveau

Mise en évidence d'un complexe capable de libérer de l'acétylcholine sous l'influence de la chaleur

Ce n'est qu'en ces dernières années que l'acétylcholine a été caractérisée dans le cerveau. DIKSHIT (1933-1934) met en évidence dans les extraits acétoniques de cerveau de chat et de lapin une substance qu'il identifie à l'acétylcholine par son action sur la pression du chat et l'intestin du lapin ; cet auteur signale en particulier que la concentration en acétylcholine est beaucoup plus grande dans les ganglions de base que dans les hémisphères et le cervelet. BARSOUM (1935) vérifie ces faits avec des extraits trichloracétiques et alcooliques. KWIATKOWSKI (1935) et PLATTNER et TZSUDZIMURA (1935) ont également recherché l'acétylcholine dans le cerveau de divers mammifères. Les chiffres donnés par ces auteurs ont été rapportés antérieurement. (Cf. ch. II, tableau 1).

Pour notre part nous nous sommes particulièrement attachée à rechercher sous quelle forme se trouve l'acétylcholine décelée de façon constante dans le cerveau des mammifères. Il convient de remarquer que, de manière générale, les extractions ont été faites par les auteurs avec l'alcool, l'acétone, l'acide trichloracétique ; or tous ces solvants sont des agents de dénaturation des substances protéiques et sont par suite capables de détruire le complexe hypothétique dans lequel l'acétylcholine serait dissimulée.

Nous avons pensé qu'en utilisant comme liquide d'extraction le liquide de Ringer ou une solution physiologique de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 nous pourrions conserver tout au moins partiellement l'acétylcholine sous cette forme dissimulée. Les faits, on le verra, ont justifié notre hypothèse ; le chauffage de la suspension aqueuse de cerveau à 70° nous permettra de libérer l'acétylcholine et il nous sera ultérieurement donné de constater que l'acétylcholine totale ainsi obtenue équivaut à celle

que les auteurs dosent couramment en utilisant les divers solvants organiques.

§ 1. — Etat libre et dissimulé de l'acétylcholine dans l'extrait total de cerveau

Nos expériences ont porté sur le cerveau de quelques mammifères : mouton, chat, cobaye, rat.

a) *Préparation de l'extrait.* — L'animal est sacrifié par saignée ; le cerveau est prélevé le plus rapidement possible et plongé immédiatement dans du liquide de Ringer ou une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000, ces solutions renfermant du sulfate d'ésérine à la concentration de 1/20.000, afin d'inhiber toute action estérasique. Après pesée, le cerveau est broyé toujours en présence de la solution ésérinée, soit à l'aide du broyeur de Latapie, soit pour les petits animaux au mortier avec du sable de Fontainebleau. La pulpe, parfaitement homogène, est additionnée de liquide physiologique ou de Ringer, afin d'amener la dilution à 3 ou 4 cm³ par gramme d'organe.

b) *Action sur le muscle de sangsue ésériné de la suspension cérébrale, normalement et après chauffage.* — L'acétylcholine contenue dans l'extrait ainsi préparé est dosée sur le muscle de sangsue ésériné.

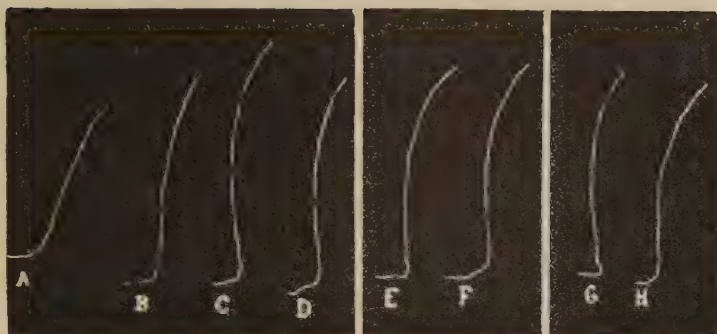
1° ESSAI DE L'EXTRAIT NON CHAUFFÉ : Un volume déterminé de la suspension d'organe correspondant à un poids connu de substance cérébrale est ajouté au bain renfermant le muscle de sangsue ; la contraction obtenue est comparée à celles réalisées avec différentes doses d'une solution étalon d'acétylcholine.

2° ESSAI DE L'EXTRAIT CHAUFFÉ : Un volume identique de la suspension d'organe est par ailleurs maintenu au bain-marie à 70° pendant 3 minutes et refroidi sous courant d'eau froide. Cet extrait provoque sur le muscle de sangsue une contraction beaucoup plus grande que précédemment.

Nous donnons le protocole type de nos expériences :

EXPÉRIENCE 3863. (*tracé 8*). — Cobaye mâle (poïds = 450 grs.) :

- 3 h. 5 Animal saigné par section des carotides.
- 3 h. 10 Prélèvement du cerveau dans 4 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ésérinée à 1/20.000. Poids du cerveau, 3,5 grs.
- 3 h. 15 Broyage au mortier.



Tracé 8. — Muscle de sangsue ésérinée (exp. 3863).

en A, 0,75 γ d'acétylcholine — en B, 1 γ d'acétylcholine — en C, 1,25 γ d'acétylcholine — en D, 1 γ d'acétylcholine — en E, 1 gr. de cerveau de cobaye — en F, 1 γ d'acétylcholine — en G, 0,25 gr. de cerveau de cobaye chauffé à 70° — en H, 1 γ d'acétylcholine.

3 h. 20 Addition de 1,5 cm³ de la solution de NaCl ésérinée à 1/20.000. Le volume de la suspension d'organe est amené à 14 cm³ avec du NaCl à 9 p. 1.000 (4 cm³ de suspension = 1 gr. d'organe). La concentration finale de l'extrait en ésérine est de 1/40.000.

3 h. 40 1°) 4 cm³ de la suspension de cerveau sont ajoutés aux 50 cm³ de Ringer renfermant le muscle de sangsue préalablement étalonné, on observe une contraction.

Après lavage et décontraction de la sangsue on ajoute au bain 1 cm³ d'ésérine à 1.10^{-4} puis 1 γ d'acétylcholine ; la contraction observée est identique à la précédente.

2°) 4 cm³ de la suspension de cerveau sont portés au bain marie à 70° pendant 3 minutes.

4 h. 00 Après refroidissement, l'extrait chauffé est dilué à 10 cm³ avec du Ringer. 2,5 cm³ (0,25 gr.) + 0,75 cm³ d'ésérine à 1.10^{-4} sont ajoutés au bain : on observe une contraction de même grandeur que celle obtenue avec 1 γ d'acétylcholine.

4 h. 10 Après lavage et décontraction, on ajoute 1 cm³ d'eau ésérinée 1.10^{-4} + 1 γ d'acétylcholine : on observe une contraction de même grandeur.

D'après cette expérience la suspension aqueuse ésérinée de cerveau de cobaye renferme après chauffage à 70° une quantité d'acétylcholine 4 fois plus grande que la suspension non chauffée.

Cette expérience a été répétée un grand nombre de fois sur le cerveau de cobaye, de mouton, de chat, de rat. On trouvera au tableau II (p. 48) les résultats de ces dosages.

c) *Identification de la substance active.* — 1° SUR LE MUSCLE DE SANGSUE : Les contractions obtenues sur le muscle de sangsue avec la suspension de cerveau, ajoutée soit avant, soit après chauffage, sont-elles bien dues à l'acétylcholine ? Nous avons pré-

levé le cerveau dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 en l'absence d'ésérine ; dans ce cas, après broyage, nous n'avons obtenu avec l'extrait non chauffé aucune activité acétylcholinique sur le muscle de sangsue ésériné ; après chauffage cet extrait est resté inactif sur le muscle de sangsue non ésériné, mais par contre il s'est montré capable de contracter le muscle de sangsue ésériné ; il nous sera donné d'insister ultérieurement sur ce fait qui permettra de définir la propriété importante que manifeste le complexe acétylcholinique d'être stable en milieu chloruré sodique.

D'autre part, il importe de signaler que l'activité disparaît complètement après traitement de l'extrait chauffé par le sérum de cheval, particulièrement riche en cholinestérase. (1)

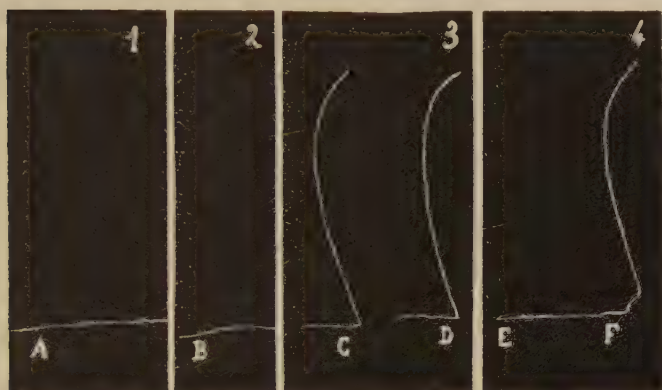
Enfin, ne convient-il pas de mettre l'augmentation d'activité de l'extrait chauffé sur le compte d'une libération, non d'acétylcholine, mais d'une substance susceptible de *sensibiliser* le muscle de sangsue vis-à-vis de l'acétylcholine ; L. BINET et MINZ (1934, b) ont montré en effet, dans le nerf vague de chien, l'existence d'une substance sensibilisant ce muscle à l'acétylcholine. Pour éliminer cette objection, nous avons ajouté, dans le bain contenant l'extrait chauffé inactivé par le sérum de cheval, une quantité connue d'acétylcholine ; nous n'avons dans ce cas observé aucune sensibilisation. Il y a donc bien par le fait du chauffage de la suspension aqueuse de cerveau, une libération d'acétylcholine dissimulée.

EXPÉRIENCE 3736. (*tracé 9*) :

- 9 h. 45 Prélèvement du cerveau de mouton.
- 10 h. 30 Broyage et dilution à 3 cm³ par gr. avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000.
- 11 h. 00 Addition de 6 cm³ d'extrait chauffé à 80°, au bain renfermant le muscle de sangsue non ésériné ; aucune action.
- 11 h. 5 Lavage. Addition de 1 cm³ d'ésérine à 1.10⁻⁴.
- 11 h. 20 Addition de 6 cm³ de l'extrait non chauffé, la sangsue ne se contracte pas.
- 11 h. 25 Lavage. Addition de 1 cm³ d'ésérine à 1.10⁻⁴ + 6 cm³ de l'extrait chauffé à 80° : on observe une forte contraction.
- 11 h. 35 Lavage. Après décontraction, addition de 1 cm³ ésériné à 1.10⁻⁴ + 1 γ d'acétylcholine : contraction du muscle de même ordre que dans l'essai précédent.

(1) Nous remercions le Docteur Brocq-Rousseu qui, pour toutes nos expériences nous a obligeamment fourni du sérum de cheval frais.

- 11 h. 15 6 cm³ de l'extrait après chauffage et refroidissement sont additionnés de 2 cm³ de sérum de cheval.
- 11 h. 40 Addition de cette dernière préparation au muscle de sangsue + 1 cm³ ésériné 1.10^{-4} sur le muscle ne réagit pas. L'addition de 1 γ d'acétylcholine au bain produit une contraction normale.



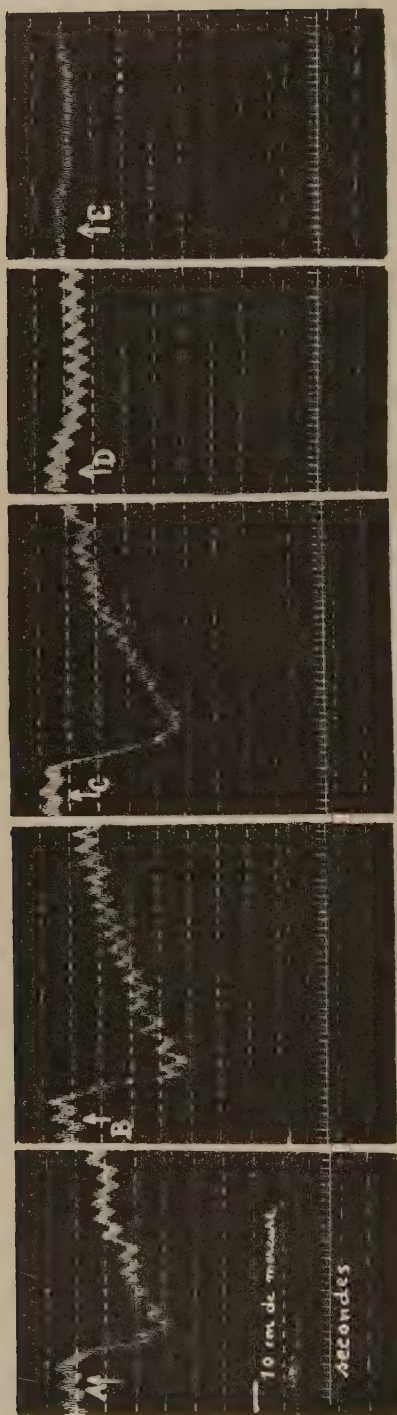
Tracé 9. — (expérience 3736).

1. Muscle de sangsue non ésériné en A, 2 gr. de cerveau de mouton
2. 3. 4. Muscle de sangsue ésériné à 2.10^{-6} — en B, 2 gr. de cerveau de mouton non chauffé — en C, 2 gr. de cerveau de mouton après chauffage à 80° — en D, 1 γ d'acétylcholine — en E, 2 gr. de cerveau de mouton chauffé mis en contact avec le sérum de cheval — en F, 1 γ d'acétylcholine.

D'après ces expériences, nous pouvons donc affirmer que les contractions provoquées sur le muscle de sangsue par les extraits de cerveau sont bien dues à la présence d'acétylcholine ou plus exactement d'un ester de la choline. Or aucun ester de la choline en dehors de l'acétylcholine n'ayant été caractérisé dans les tissus animaux, il est fort probable que la substance active est bien l'acétylcholine.

2° SUR LA PRESSION SANGUINE DU CHAT ET LE MUSCLE RECTUS ABDOMINIS DE GRENOUILLE : Afin de préciser ces données nous avons cependant fait agir quelques extraits de cerveau comparativement sur le muscle *rectus abdominis* de la grenouille et le muscle de sangsue : les dosages concordent entièrement.

Enfin, nous avons également utilisé la pression du chat, test très sensible pour l'acétylcholine, mais rendant nécessaire l'ultrafiltration de l'extrait. Les quantités d'acétylcholine trouvées dans ces conditions sur la pression du chat ésériné et sur le muscle de sangsue sont de même ordre.



Tracé 10. — Pression carotidienne de chat (expérience 3798).

en A, injection intraveineuse de 0,5 γ de chlorure d'acétylcholine.

en B, injection de 2 cm^3 de l'extrait ultrafiltré de cerveau de mouton chauffé (ultrafiltrat II).

en C, injection de 0,6 γ de chlorure d'acétylcholine.

en D, injection de 2 cm^3 de l'extrait de cerveau de mouton non chauffé (ultrafiltrat D).

Après injection de 1 mgr. d'atropine p. kgr., injection en E de 2 cm^3 de l'ultrafiltrat II.

EXPÉRIENCE 3798 :

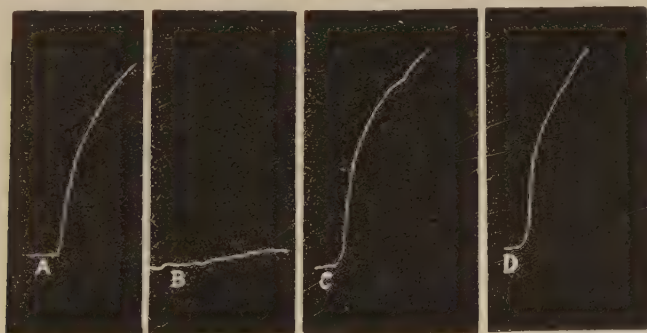
1° Préparation de l'extrait.

- 9 h. 30 Prélèvement d'un cerveau de mouton : poids 120 grs.
10 h. 30 Broyage au broyeur de Latapie et dilution avec 120 cm³ de NaCl à 9 p. 1.000. Centrifugation pendant 20 minutes, décantation, lavage avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000 et deuxième centrifugation. Les liquides de décantation sont réunis et soumis à l'ultrafiltration (Ultrafiltrat I, renfermant 2 grs. d'organe pour 5 cm³ d'extrait).

Le résidu est repris par une solution de NaCl à 9 p. 1.000, réparti dans des tubes à essai et chauffé pendant 3 minutes à 80°. Après refroidissement, on centrifuge à 2 reprises ; les liquides de décantation sont réunis et ultrafiltrés (Ultrafiltrat II, renfermant 2 grs. d'organe pour 5 cm³).

2° Dosage par action sur la pression sanguine du chat. (tracé 10).

- 15 h. 00 Chat 4 kgr. anesthésié par injection intrapéritonéale de 0,5 gr. de dial par Kg. (1).
15 h. 30 Pression carotidienne : 16 cm. de mercure.
15 h. 45 Injection de 0,5 mgr. de sulfate d'ésérine dans la veine fémorale : sans action.
15 h. 52 Injection de 0,5 γ d'acétylcholine : hypotension de 3 cm. de mercure, la pression revient à la normale après 30 secondes.
15 h. 55 Injection de 2 cm³ de l'ultrafiltrat II : hypotension de 4 cm. de mercure, la pression revient à la normale après 40 secondes.
16 h. 00 Injection de 0,6 γ d'acétylcholine : hypotension de même grandeur et de même durée.
16 h. 16 Injection de 2 cm³ de l'ultrafiltrat I : sans action.
16 h. 18 Injection de 1 mgr. p. kgr. de sulfate d'atropine.



Tracé 11. Muscle de sangsue ésériné (expérience 3798).

en A, 1 γ de chlorure d'acétylcholine — en B, 4 cm³ de l'extrait de cerveau de mouton non chauffé (extrait I) — en C, 4 cm³ de l'extrait de cerveau chauffé (extrait II) — en D, 1 γ de chlorure d'acétylcholine.

(1) Nous tenons à remercier les Laboratoires Ciba qui nous ont aimablement fourni le dial utilisé dans nos expériences.

- 16 h. 20 Injection de 2 cm³ de l'ultrafiltrat II : sans action.
 16 h. 30 Injection de 1 γ d'acétylcholine : sans action.

3° Dosage par action sur le muscle de sangsue éseriné. (tracé 11).

La sensibilité de la sangsue est d'abord éprouvée

- 17 h. 00 Addition au bain de 1 cm³ éserine 1.10⁻⁴ + 4 cm³ de l'ultrafiltrat I : aucune action.
 17 h. 10 Après lavage, addition de 1 cm³ éserine + 4 cm³ de l'ultrafiltrat II : contraction.
 17 h. 20 Après lavage et décontraction, addition de 1 cm³ d'éserine puis 1 γ d'acétylcholine : contraction légèrement plus faible que la précédente.

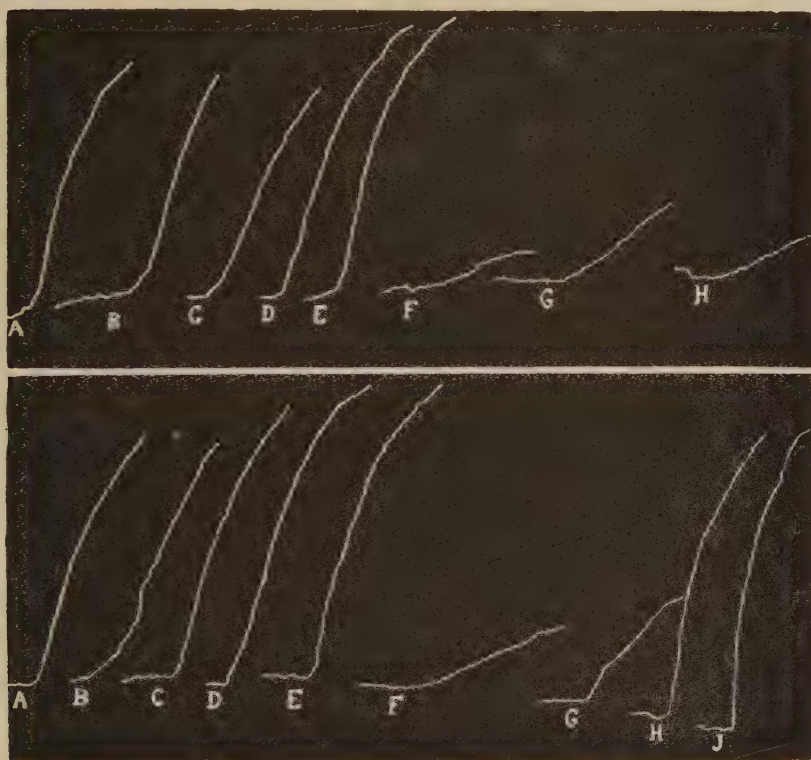
Nous groupons dans le tableau II, les résultats d'une série d'expériences :

TABLEAU II

*Quantités d'acétylcholine contenues dans le cerveau
de divers animaux avant et après chauffage de l'organe*

ANIMAL	N° d'expérience	Liquide d'extraction	Concentration en éserine	AC en γ par gr.		AC libre
				normalement	après Chauffage à 70°	AC totale
COBAYE	3680	Eau	1/80.000	0,2	1	5
	3682bis	»	1/100.000	0,25	1	4
	3689bis	»	1/80.000	0,35	1,3	3,7
	3733	Ringer	1/80.000	0,7	1,5	2,1
	3764	Eau	1/80.000	0,4	1,2	3
	3764bis	NaCl 9 p. 1000	1/80.000	0,8	3	3,7
	3856	»	1/40.000	1	4	4
	3860	»	1/40.000	0,8	2,75	3,6
	3863	»	1/40.000	1	4	4
	3866	»	1/40.000	1	3,8	3,8
	3872	»	1/40.000	1	4,8	4,8
	3901	»	1/40.000	1	5	5
	3910	»	1/40.000	2	5	2,5
	3920	»	1/20.000	1,1	3,3	3
	3960	»	1/20.000	0,6	3	5
	3981bis	»	1/20.000	1,5	6	4
RAT	3682	Eau	1/100.000	0,17	0,7	4,1
	3683	Ringer	1/80.000	0,5	1,25	2,5
	3896	NaCl 9 p. 1000	1/40.000	0,8	1,6	2
	3902	»	1/40.000	1	3,1	3,1
	3902bis	»	1/40.000	0,8	3,2	4
MOUTON	3754	»	1/40.000	0,35	0,7	2
	3768	»	1/60.000	0,4	0,8	2
	3762	»	1/40.000	0,35	1	2,8
	3771bis	»	1/30.000	0,25	0,8	3,2
	3774	»	1/40.000	0,3	0,7	2,3
	3798	»	1/40.000	0,4	0,9	2,25
	3945	»	1/40.000	0,25	0,6	2,4
	3954	»	1/40.000	0,25	0,5	2
	3974	»	1/40.000	0,3	0,6	2
	3983	»	1/40.000	0,4	0,8	2
	3984	»	1/40.000	0,25	0,6	2,4
CHAT	3800	»	1/50.000	1	1,5	3
	3800bis	»	1/40.000	0,8	1,4	1,75
	3375	»	1/30.000	0,25	0,75	3
	3380	»	1/40.000	0,2	0,5	2,5

De l'examen de ces résultats, il ressort que la quantité d'acétylcholine contenue dans le cerveau est variable d'un individu à l'autre dans la même espèce. Cependant, nous mettrons sur le compte d'une concentration insuffisante en ésérine la faible teneur observée dans nos premières expériences en particulier sur le cerveau de cobaye ; la concentration en ésérine de la suspension de cerveau était de 1/80.000 et même de 1/100.000. Nous avons adopté par la suite une concentration d'ésérine de 1/40.000



Tracé 12. — Action sur le muscle de sangsue ésériné, de la suspension aqueuse ésérinée de différentes régions du cerveau de mouton, avant et après chauffage (expérience 3873).

Tracé supérieur. — en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 0,8 gr de bulbe en C, 0,5 γ d'acétylcholine — en D, 0,4 gr. bulbe après chauffage à 80° — en E, 0,7 γ d'acétylcholine — en F, 3 gr. cervelet — en G, 0,25 γ d'acétylcholine — en H, 3 gr. cervelet après chauffage à 80°.

Tracé inférieur. — en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 1 gr. cerveau intermédiaire — en C, 0,5 γ d'acétylcholine — en D, 0,5 gr. cerveau intermédiaire après chauffage à 80° — en E, 0,6 γ d'acétylcholine — en F, 1 gr. hémisphère — en G, 0,3 γ d'acétylcholine — en H, 1 gr. hémisphère après chauffage à 80° — en J, 0,6 γ d'acétylcholine.

et dans ces conditions les chiffres obtenus se sont montrés beaucoup plus constants.

Considérant la quantité d'acétylcholine dosée avant chauffage comme existant à l'état *libre* et la quantité dosée après chauffage (somme de l'acétylcholine libre et de l'acétylcholine libérée) comme acétylcholine *totale*, nous pouvons donc, en faisant la moyenne des dosages effectués chez le cobaye en présence d'une quantité suffisante d'ésérine, évaluer la teneur en acétylcholine libre du cerveau de cet animal à 1,1 γ par gr. et la teneur en acétylcholine totale à 4 γ par gr.

Il nous semble intéressant d'attirer l'attention sur le fait que le rapport de l'acétylcholine libre à l'acétylcholine totale, apparaît assez constant pour chaque espèce. Nous voyons par exemple que chez le cobaye, animal chez lequel nous avons fait un grand nombre de dosages, ce rapport est le plus souvent voisin de 4 et d'autre part, chez le mouton, un nombre suffisant d'expériences nous permet d'évaluer ce rapport aux environs de 2.

§ 2. — Acétylcholine libre et dissimulée dans les différentes régions du cerveau

BARSOU (1935) a signalé les différentes teneurs en acétylcholine des diverses régions du cerveau d'homme, de chien et de bœuf. Il nous a semblé intéressant de rechercher s'il existait également des différences dans le rapport entre l'acétylcholine libre et l'acétylcholine totale. Cette étude a été faite sur le cerveau de mouton suivant la même technique que précédemment (*tracé 12*). Le tableau III résume nos expériences.

TABLEAU III

Teneur moyenne en acétylcholine des différentes régions du cerveau de mouton avant et après chauffage

	Acétylcholine en γ par. gr.	
	normalement	après chauffage à 70°
Substance blanche (hémisphères).	0,15	0,2
Substance grise. »	0,2	0,6
Bulbe. »	0,6	1,5
Cervelet. »	0,1	0,1
Cerveau intermédiaire.	0,4	1,2
Hémisphères »	0,25	0,5

D'après ces résultats, la substance blanche, d'ailleurs peu riche en acétylcholine libre, ne semble pas renfermer sensiblement d'acétylcholine dissimulée; les faibles différences observées entre l'extrait dosé avant et après chauffage pouvant être mises sur le compte d'une séparation imparfaite des substances blanches et grises des hémisphères. Quant à la substance grise, il est évident qu'au cours de la dissection une partie de l'acétylcholine existant à l'état libre est susceptible d'être détruite par mise en contact avec les estérases. Nous remarquerons en outre que si le bulbe et le cerveau intermédiaire sont très riches en acétylcholine dissimulée, le cervelet par contre ne semble pas en renfermer.

En résumé, il résulte de nos expériences qu'il existe dans le cerveau des mammifères une certaine quantité d'acétylcholine libre, ou tout au moins sous une forme assez instable pour être libérée par broyage de l'organe avec du liquide physiologique éseriné, et en outre une quantité généralement plus importante qui serait dissimulée sous forme de complexe et susceptible d'être libérée notamment par un chauffage à 70°. Il ne s'agit pas là d'une substance sensibilisant le muscle de sangsue à l'acétylcholine comme il résulte de nos expériences. Le complexe acétylcholinique, et nous reviendrons sur ce fait, n'est pas attaqué par les estérases dans le liquide physiologique.

Enfin, le complexe est inégalement réparti dans les différentes régions du cerveau, les régions les plus riches en acétylcholine totale renfermant également la plus grande quantité d'acétylcholine à l'état dissimulé.

CHAPITRE IV

Etude « in vitro » des propriétés du complexe cérébral

Afin de préciser la nature du complexe renfermant l'acétylcholine dissimulée, nous avons été amenée à en étudier les propriétés, et en particulier sa solubilité et sa stabilité sous l'influence de divers agents. Pour éliminer l'action de la cholinestérase, tant sur l'acétylcholine libre que sur le complexe, nous en ferons tout d'abord l'étude en présence d'ésérine. Nous étudierons ensuite le rôle important de cette substance sur la stabilité du complexe. Nous serons amenée enfin à préciser dans quelles conditions cependant le maintien du complexe peut être assuré en l'absence d'ésérine, comme nous l'avons signalé dans un travail antérieur (E. CORTEGGIANI, 1937 b).

§ 1. — Propriétés du complexe étudié en présence d'ésérine

a) *Action de l'eau.* — Nous avons recherché si le complexe mis précédemment en évidence dans la suspension aqueuse ésérinée de cerveau était soluble dans l'eau. Pour ces expériences réalisées sur le cerveau de mouton et de cobaye, nous avons opéré de la manière suivante :

Le cerveau est broyé dans l'eau ésérinée à 1/40.000, et le volume de la suspension d'organe est amené à 3 centimètres cubes par gr. Après centrifugation, le liquide surnageant est décanté, le résidu est additionné de 2 centimètres cubes d'eau ésérinée à 1/40.000 par gr. d'organe ; on procède à une deuxième centrifugation et les deux liquides de décantation sont réunis. L'acétylcholine contenue dans cet extrait est dosée par action sur le muscle de sangsue ésériné ; un deuxième dosage est effectué après chauffage du même extrait au bain marie à 80° pendant 3 minutes : les contractions obtenues par addition des extraits aqueux ésérinés chauffés et non chauffés sont identiques : le complexe est donc insoluble dans l'eau ; par suite, il doit être possible de le caractériser dans le résidu ; à cet effet, après un lavage à l'eau ésérinée pour éliminer toute trace d'acétylcholine

libre, le résidu est dilué avec 2 centimètres cubes par gr. d'eau ésérinée ; il est facile de constater alors, par essai sur le muscle de sangsue de la suspension ainsi obtenue, qu'elle ne renferme pas d'acétylcholine ; mais, par contre, après chauffage de cette suspension au bain-marie à 80°, on peut déceler une quantité importante d'acétylcholine.

Le complexe se trouve donc dans la fraction du cerveau insoluble dans l'eau.

b) *Action d'une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000.*
— Certaines substances, en particulier diverses globulines, étant insolubles dans l'eau et solubles dans les solutions salines diluées, nous avons tenté de remplacer l'eau ésérinée par le chlorure de sodium à 9 p. 1.000, ésériné dans les mêmes proportions, pour solubiliser le complexe. Nous avons opéré comme précédemment par centrifugations et décantations successives. Le complexe a été retrouvé intégralement dans le résidu.

Le complexe est donc insoluble dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000.

c) *Action du pH. — Stabilité du complexe en milieu acide.*
— Dans les expériences précédentes, le pH de la suspension cérébrale dans l'eau ou le chlorure de sodium à 9 p. 1.000, mesuré par la méthode électrométrique était toujours voisin de 7. Il nous a semblé intéressant de rechercher l'influence des modifications du pH sur la stabilité du complexe acétylcholinique ; mais nous nous sommes heurtée à une difficulté : malgré l'emploi de solutions tamponnées nous n'avons pu réaliser l'extraction à un pH bien déterminé, le cerveau étant également par lui-même fortement tamponné. Avec l'emploi de solutions tampons à pH acide en particulier, le pH de la suspension était toujours supérieur de plusieurs unités à celui du liquide d'extraction. Nous avons donc renoncé à l'emploi de ces solutions, d'autant plus que nous avons remarqué qu'elles modifiaient parfois la sensibilité du muscle de sangsue à l'acétylcholine.

Nous avons utilisé comme liquide d'extraction des solutions d'acide chlorhydrique plus ou moins concentrées et nous avons déterminé le pH de la suspension d'organe obtenue.

EXPÉRIENCE 3712 bis :

1/2 cerveau de mouton (poids = 50 grs.), est prélevé dans 100 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000 additionnée de 2,5 cm³ d'acide chlorhydrique (pH de la solution = 1,6) et de 1 cm³ de sulfate d'ésé-

rine à 2.10^{-3} . Après broyage, on détermine le pH de la suspension, ce $pH = 5,1$. On neutralise et la suspension est ajoutée au bain renfermant le muscle de sangsue ; 3 grs. d'organe donnent une contraction correspondant à 1.6γ d'acétylcholine. La même contraction est observée si l'essai est pratiqué après chauffage.

Ainsi le complexe acétylcholinique paraît détruit par une solution d'acide chlorhydrique à $pH = 1,6$. Par contre, dans l'expérience 3986, où l'extraction a été faite avec une solution d'acide chlorhydrique à $pH = 2$, le complexe n'était pas détruit ; notons que, dans ce dernier cas, le pH de la suspension était égal à 6,1, 12 minutes après le broyage.

Un acide fort détruit le complexe, le fait n'est pas douteux, mais les conditions rapides dans lesquelles la substance cérébrale provoque un effet tampon ne nous ont pas permis de préciser le pH limite auquel se produit la libération de l'acétylcholine.

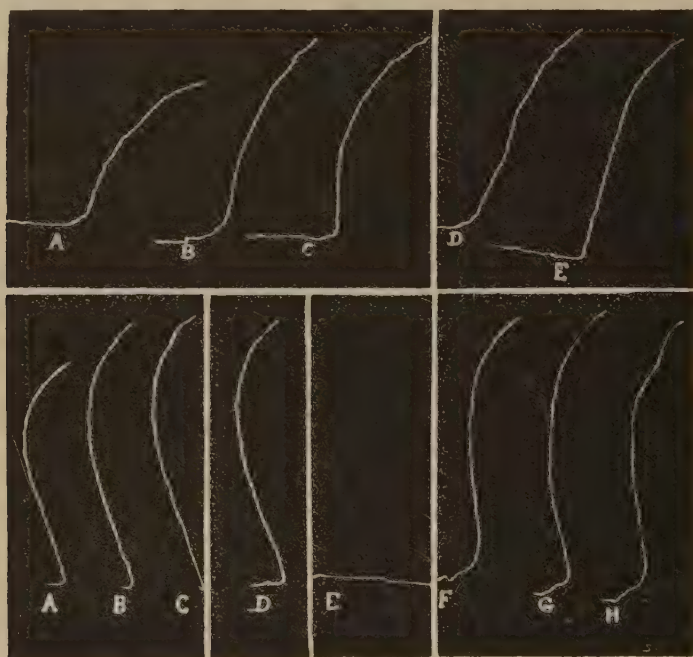
d) *Action des solvants organiques*. — Nous avons recherché l'action de divers solvants organiques, alcool, acétone, acide trichloracétique, sur le complexe cérébral.

Afin de pouvoir comparer ces différentes méthodes d'extraction entre elles et avec l'extrait aqueux, nous avons adopté la technique suivante : un ou plusieurs cerveaux sont broyés en présence d'ésérine ; la pulpe obtenue est divisée par pesée en plusieurs fractions, traitées respectivement par différents solvants organiques ; l'une d'elle est diluée avec du chlorure de sodium à 9 p. 1.000 et l'acétylcholine y est dosée directement, avant et après chauffage à 80° , sur le muscle de sangsue ésériné ; les teneurs en acétylcholine trouvées dans ces conditions seront comparées à celles des autres extraits, dosés sur le même test, après élimination des divers solvants. Pour les extraits alcooliques et acétoniques, nous avons procédé, après filtration, à une évaporation au bain-marie à 40° sous pression réduite et dans quelques cas nous avons pratiqué ensuite un traitement à l'éther pour enlever les lipides. Quant à l'extrait trichloracétique, après filtration, nous l'avons soumis à 5 à 6 traitements à l'éther jusqu'à réaction neutre ; l'éther dissous dans la phase aqueuse était ensuite évaporé sous pression réduite.

Nous nous sommes particulièrement attachée à éviter dans le traitement des extraits une hydrolyse, aussi bien chimique que diastasique, de l'acétylcholine. Dans ce but, nous avons opéré le plus rapidement possible, toujours en présence d'ésérine,

et à une température ne dépassant jamais 40°. Signalons encore que la plupart de nos extractions, tant alcooliques, qu'acétoniques, ont été faites en milieu acide. Afin de préciser les conditions expérimentales, nous donnons d'ailleurs les protocoles de quelques-unes de nos expériences.

Dans une première série d'expériences nous avons, d'abord étudié comparativement l'acétylcholine libérée dans les extraits *alcooliques* (neutres et chlorhydriques), *trichloracétiques* et dans la suspension *aqueuse* de cerveau de mouton. L'acétylcholine a été dosée dans ces extraits ainsi que dans les résidus de l'extraction, avant et après chauffage sur le muscle de sangsue ésériné.



Tracé 13. — (expérience 3754 bis).

Comparaison de l'activité, sur le muscle de sangsue, des extraits aqueux, alcoolique et trichloracétique de cerveau de mouton.

Tracé supérieur. — Muscle de sangsue I, ésériné à $2 \cdot 10^{-6}$ — en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 2 gr. suspension aqueuse ésérinée de cerveau de mouton — en C, 0,6 γ d'acétylcholine — en D, 1 gr. suspension aqueuse ésérinée et chauffée à 80° — en E, 0,6 γ d'acétylcholine.

Tracé inférieur. — Muscle de sangsue II ésériné à $2 \cdot 10^{-6}$ — en A, 1 γ d'acétylcholine — en B, 2 gr. extrait alcoolique cerveau de mouton — en C, 1,3 γ d'acétylcholine — en D, 2 gr. extrait alcoolique après chauffage à 80° — en E, 2 gr. extrait alcoolique après traitement par la soude — en F, 2 gr. extrait trichloracétique — en G, 1,4 γ d'acétylcholine — en H, 2 gr. extrait trichloracétique après chauffage à 80°.

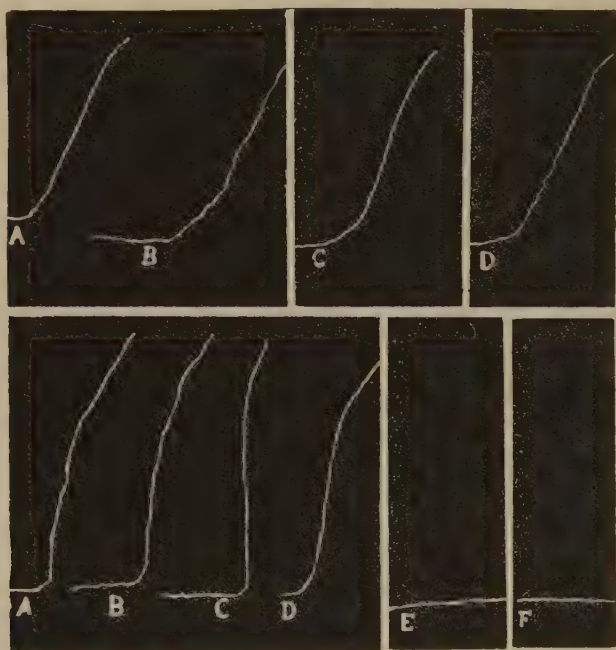
EXPÉRIENCE 3754 bis. (tracé 13) :

- 10 h. 00 Prélèvement d'un cerveau de mouton (poids = 105 grs.).
- 10 h. 45 Le cerveau est découpé en petits fragments dans 10,5 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000, ésérinée à 5.10⁻⁴, et broyé au Latapie.
- 11 h. 00 Préparation de divers extraits : *Extrait salin* : 22 grs. de la pulpe ainsi obtenue (soit 20 grs. de cerveau frais) sont dilués avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000 amenant le volume de la suspension à 3 cm³ par gr. — *Extrait alcoolique neutre* : 22 grs. sont additionnés de 5 volumes d'alcool à 95°. — *Extrait alcoolique acide* : 22 grs. sont traités par 5 volumes d'alcool chlorhydrique N/100. — *Extrait trichloracétique* : 22 grs. sont additionnés de 1 volume d'acide trichloracétique à 20 p. 100.
- 11 h. 30 La quantité d'acétylcholine renfermée dans l'extrait *aqueux* est dosée sur le muscle de sangsue ésériné avant chauffage : 6 cm³ de la suspension d'organe (2 gr. de cerveau) donnent une courbe équivalente à 0,6 γ d'acétylcholine.
Après chauffage à 80°, 1 gr. de cerveau renferme 0,6 γ d'acétylcholine.
- 12 h. 00 Les extraits *alcooliques* et *trichloracétiques* sont filtrés et les résidus sont lavés respectivement avec de l'alcool et de l'acide trichloracétique puis séchés.
Les filtrats alcooliques sont évaporés sous pression réduite à une température de 40°. Le filtrat trichloracétique est soumis à 5 traitements à l'éther pour éliminer l'acide trichloracétique.
- 16 h. 00 L'extrait *alcoolique neutre*, après évaporation de l'alcool, est repris par une solution de NaCl à 9 p. 1.000, et une quantité d'extrait correspondant à 2 grs. d'organe est ajouté au bain renfermant le muscle de sangsue préalablement étalonné, la contraction obtenue correspond à 1,3 γ d'acétylcholine.
Après chauffage de l'extrait à 80° la contraction obtenue est identique avec une même dose d'extrait. Ces extraits, chauffés ou non chauffés, sont complètement inactifs sur le muscle de sangsue après traitement à volumes égaux avec de la soude 2 N pendant quelques minutes et neutralisation avant l'essai.
- 17 h. 00 L'extrait *alcoolique acide*, traité dans les mêmes conditions que l'extrait neutre, est dosé, après neutralisation, sur le muscle de sangsue. La quantité d'acétylcholine est évaluée à 1,3 γ pour 2 grs. d'organe et ne varie pas après chauffage de l'extrait à 80°.
- 18 h. 00 L'extrait *trichloracétique*, après vérification de sa neutralité au papier de tournesol, est dosé également sur le muscle de sangsue. Un prélèvement correspondant à 2 grs. d'organe provoque une contraction équivalente à 1,4 γ d'acétylcholine. Cette contraction n'est pas accrue par le chauffage de l'extrait à 80°. D'autre part, l'activité de l'acétylcholine dans ces 2 cas disparaît après traitement de l'extrait par la soude 2 N.

Les résidus des extractions alcooliques et trichloracétiques sont séchés, conservés à la glacière et repris le len-

demain par une solution de NaCl à 9 p. 1.000. Après filtration et neutralisation, ces extraits, chauffés et non chauffés, n'ont aucune activité sur le muscle de sangsue.

De cette expérience, il résulte que le complexe est également détruit dans les extraits alcooliques et trichloracétiques de cerveau. La quantité d'acétylcholine trouvée dans ces extraits est comparable à celle dosée dans la suspension aqueuse après chauffage. De plus, si dans l'extrait aqueux il est possible de libérer une quantité supplémentaire d'acétylcholine par le chauffage à 80° , celui-ci est par contre sans aucune action sur les extraits



Tracé 14. — (expérience 3954).

Comparaison de l'activité sur le muscle de sangsue des extraits aqueux, alcoolique et acétonique de cerveau de mouton.

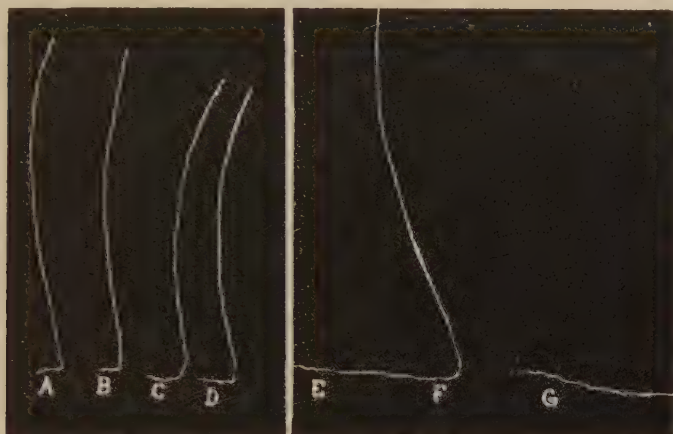
Tracé supérieur. — Muscle de sangsue I éseriné à 2.10^{-6} — en A, $0,5 \gamma$ d'acétylcholine — en B, 2 gr. cerveau (suspension aqueuse éserinée) — en C, $0,5 \gamma$ d'acétylcholine — en D, 1 gr. cerveau (suspension aqueuse éserinée et chauffée à 80°).

Tracé inférieur. — Muscle de sangsue II éseriné à 2.10^{-6} — en A, 2 gr. cerveau (extrait alcoolique) — en B, $0,9 \gamma$ d'acétylcholine — en C, 1γ d'acétylcholine — en D, 2 gr. cerveau (extrait acétonique) — en E, 2 gr. de l'extrait alcoolique après hydrolyse alcaline — en F, 2 gr. de l'extrait acétonique après hydrolyse alcaline

alcooliques et trichloracétiques aussi bien que sur les résidus de ces extraits quant à la libération d'acétylcholine. Nous remar-

querons en outre, que les extractions par l'alcool neutre et l'alcool chlorhydrique nous ont donné les mêmes résultats.

Dans une autre série d'expériences, nous avons comparé les extraits *alcooliques* et *acétoniques* de cerveau, comme le montre le protocole suivant :



Tracé 15. — (expérience 3954).

Action sur le muscle de sangsue ésériné des extraits acétonique et alcoolique de cerveau après traitement par l'éther.

en A, 0,9 γ d'acétylcholine — en B, 2 gr. d'extrait acétonique après traitement par l'éther — en C, 2 gr. extrait alcoolique après traitement par l'éther — en D, 0,8 γ d'acétylcholine — en E, 4 gr. d'extrait étheré de l'extrait alcoolique — en F, 1 γ d'acétylcholine — en G, 4 gr. de l'extrait étheré de l'extrait acétonique.

EXPÉRIENCE 3954 (tracés 14 et 15) :

- 10 h. 30 Prélèvement de 2 cerveaux de mouton (poids = 200 grs.).
- 11 h. 30 Broyage en présence de 40 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ésérinée à $2,5 \cdot 10^{-4}$.
- 11 h. 45 *Extrait salin* : 12 grs. de pulpe cérébrale (10 grs. de cerveau) sont dilués avec 18 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000.
Extrait alcoolique : 72 grs. sont additionnés de 400 cm³ d'alcool chlorhydrique N/100.
Extrait acétonique : 72 grs. sont additionnés de 400 cm³ d'acétone chlorhydrique N/100.
- 13 h. 00 Filtration et évaporation des extraits alcoolique et acétonique au bain-marie à 40° sous pression réduite.
- 13 h. 15 Essai de l'extrait *salin* sur le muscle de sangsue : 6 cm³ de la suspension (2 grs. d'organe) provoquent une contraction équivalente à 0,5 γ d'acétylcholine. 3 cm³ du même extrait après chauffage à 80° provoquent la même contraction.
- 16 h. 30 L'extrait *alcoolique*, après élimination de l'alcool, est repris par une solution de NaCl à 9 p. 1.000 (2 cm³ de la solution = 1 gr. de cerveau) et neutralisé avec du bicarbonate de sodium. L'acétylcholine contenue dans l'extrait est éva-

luée sur le muscle de sangsue à 0,9 γ pour 2 grs. de cerveau. On constate sa destruction par hydrolyse alcaline.

- 17 h. 00 L'extrait *acétonique*, après évaporation de l'acétone, est neutralisé et ramené avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000 à un volume de 2 cm³ par gr. de cerveau. L'acétylcholine contenue dans l'extrait est également évaluée sur le muscle de sangsue avant et après chauffage à 0,9 γ pour 2 grs. d'organe.

Les extraits alcooliques et acétoniques sont ensuite traités par l'éther et abandonnés pendant la nuit. Le lendemain on procède à la décantation. L'éther qui a servi à l'extraction est recueilli et, après évaporation, on constate que le résidu repris par l'eau n'a aucune action sur le muscle de sangsue. Par ailleurs les extraits acétoniques et alcooliques purifiés par l'éther renferment des quantités d'acétylcholine dosées sur le muscle de sangsue égales à 0,8 γ pour l'extrait alcoolique et 0,9 γ pour l'extrait acétonique pour 2 grs. de cerveau.

Le résidu acétonique séché, puis repris par l'eau et chauffé à 80° est sans action sur le muscle de sangsue.

Le traitement par l'acétone détruit donc le complexe acétylcholinique et les quantités d'acétylcholine libérées sont de même ordre que celles obtenues avec l'extrait alcoolique et avec la suspension aqueuse chauffée. D'autre part, insistons sur le fait que l'éther n'est pas susceptible d'entraîner même partiellement l'acétylcholine extraite par l'alcool ou l'acétone.

Enfin, il nous a semblé intéressant de comparer les quantités d'acétylcholine extraites du cerveau de mouton par l'alcool avant et après chauffage de l'organe.

EXPÉRIENCE 3755 (*tracé 16*) :

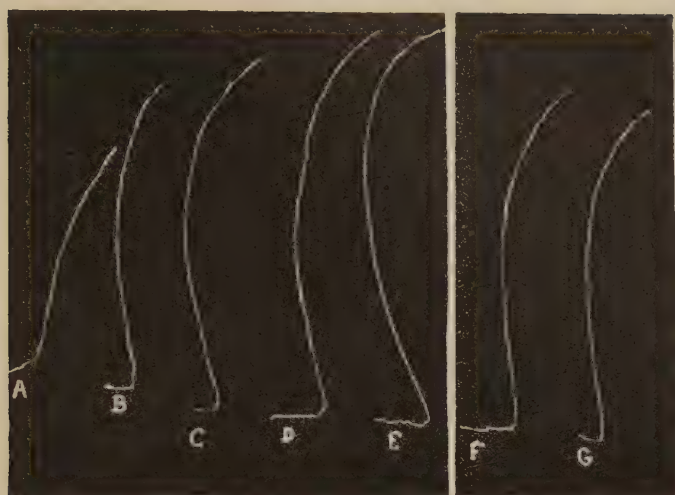
- 11 h. 00 Prélèvement du cerveau (poids : 120 grs.) dans 80 cm³ d'une solution de sulfate d'ésérine à 1/20.000.

- 12 h. 00 Broyage. — D'une part 50 grs. de la suspension d'organe (environ 30 grs. de cerveau) sont traités par 5 volumes d'alcool à 95° (I). D'autre part 50 grs. de la suspension sont chauffés à 80° au bain-marie puis additionnés d'une même volume d'alcool (II).

Les extraits sont laissés pendant 1 heure en contact avec l'alcool, filtrés et évaporés au bain-marie à 40°, sous pression réduite.

- 16 h. 00 Les extraits débarrassés de l'alcool sont repris par l'eau (2 cm³ par gr. d'organe) et dosés sur le muscle de sangsue. — 2 grs. de l'extrait I donnent une contraction équivalente à 1,4 γ d'acétylcholine, 2 gr. de l'extrait II donnent une contraction légèrement inférieure, évaluée à 1,3 γ environ.

D'après cette expérience, si l'extraction alcoolique de l'acétylcholine est réalisée après chauffage de l'organe, la quantité libérée n'est pas plus grande que dans l'extraction alcoolique normale.



Tracé 16. — (expérience 3755).

Comparaison de l'activité sur le muscle de sangsue éseriné des extraits alcooliques de cerveau de mouton avant et après chauffage de l'organe.

en A, 0,75 γ d'acétylcholine — en B, 1 γ d'acétylcholine — en C, 1,25 γ d'acétylcholine — en D, 2 gr. d'extrait alcoolique de cerveau de mouton non chauffé — en E, 1,5 γ d'acétylcholine — en F, 2 gr. d'extrait alcoolique de cerveau chauffé à 80° — en G, 1,25 γ d'acétylcholine.

Les résultats des expériences précédentes nous amènent à conclure, en définitive, malgré quelques divergences parfois observées que les *solvants organiques utilisés détruisent le complexe acétylcholinique en libérant une quantité d'acétylcholine identique à celle obtenue par chauffage de la suspension aqueuse de cerveau entre 70° et 80°*. (E. CORTEGGIANI, 1937, a). Il est facile, en se reportant au tableau IV, de constater le bien fondé de telles conclusions.

TABEAU IV

Comparaison de la teneur en acétylcholine, exprimée en γ par gr. d'organe, des extraits de cerveau par divers solvants :

N° des Expériences	Animal	Extraits			Suspension aqueuse	
		Alcoolique	Acétonique	Trichloracétique	Avant chauffage	Après chauffage
3701	Mouton		0,5		0,2	0,5
3710	»	0,75			0,3	0,7
3754 bis	»	0,65	0,7	0,7	0,3	0,6
3755	»	0,7				
3954	»	0,45	0,45		0,25	0,5
3944	»	0,5		0,45	0,25	0,6
3956	Cobaye	3,1	2,60		0,5	3,6

e) *Action de la température.* — Dans toutes les expériences précédentes, nous avons obtenu une destruction du complexe avec libération d'acétylcholine en soumettant le cerveau à une température de 70 à 80° pendant 3 minutes. Nous nous sommes demandée si la libération de l'acétylcholine par la chaleur n'était pas liée à un phénomène de coagulation des protides du cerveau, étant donné que l'alcool et l'acétone, qui produisent un effet analogue, sont également des agents de coagulation. Il importait de préciser la température de libération du complexe ; il existe en particulier dans le cerveau des globulines qui coagulent dès 40° et nous avons recherché si, déjà à cette température, il était possible d'obtenir une libération d'acétylcholine.

Nous donnons un protocole type de l'une de nos expériences :

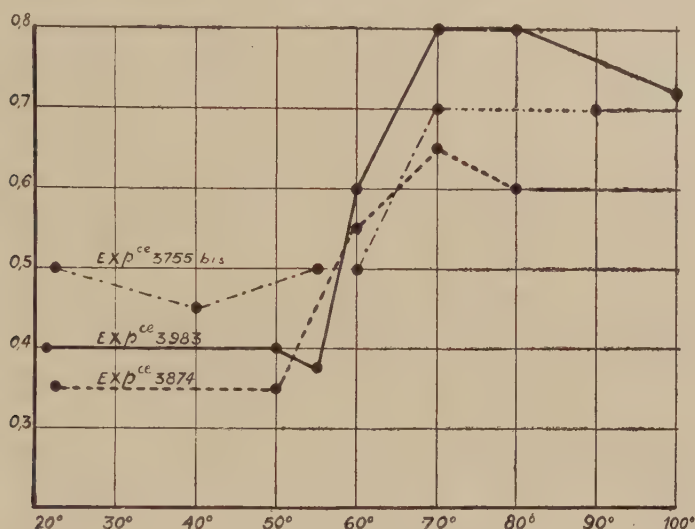
EXPÉRIENCE 3983. — Cerveau de mouton :

- 10 h. 30 Prélèvement du cerveau (poids : 100 grs.).
- 11 h. 30 Broyage en présence de 50 cm³ d'ésérine à 1.10⁻⁴. Le volume de la suspension d'organe est amené à 3 cm³ par gr. d'organe avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ; la suspension est rendue parfaitement homogène par agitation, et répartie dans des tubes gradués. Ces tubes seront portés successivement au bain-marie à diverses températures pendant 3 minutes. Après refroidissement, les dosages d'acétylcholine sont effectués, dans les diverses préparations, sur le muscle de sangsue.
- 11 h. 55 Essai de 6 cm³ de suspension aqueuse (2 grs. d'organe) sur le muscle de sangsue : la contraction correspond à celle obtenue avec 0,8 γ d'acétylcholine. 3 cm³ de la suspension (1 gr. d'organe) après chauffage à 80° pendant 3 minutes renferment 0,8 γ d'acétylcholine.
- 12 h. 35 1 gr. après chauffage à 60° pendant 3 minutes renferme 0,8 γ d'acétylcholine ; après chauffage à 80°, la courbe est contient alors 0,8 γ d'acétylcholine.
- 13 h. 25 2 grs. après chauffage à 50° donnent une courbe évaluée à 0,8 γ d'acétylcholine ; après chauffage à 80°, la courbe est de 1,5 γ.
- 14 h. 00 2 grs. après chauffage à 55° contiennent 0,75 γ d'acétylcholine.
- 14 h. 30 2 grs. à 70° contiennent 1,6 γ d'acétylcholine.
- 15 h. 00 2 grs. à 100° contiennent 1,4 à 1,5 γ d'acétylcholine.

Sur le *graphique I* nous reportons les résultats de quelques expériences analogues (3755 bis, 3874), en portant les températures de chauffage en abscisses et en ordonnées les quantités d'acétylcholine en γ par gr. contenues dans la suspension cérébrale.

Le complexe acétycholinique est stable jusqu'à 55° ; à 60° il est déjà partiellement détruit et il faut atteindre 70° pour ob-

tenir sa destruction totale. Entre 70 et 80° la quantité d'acétylcholine libérée est pratiquement constante. Nous avons remarqué, de façon générale que, lorsque la température de chauffage atteint 100°, les quantités d'acétylcholine libérées sont parfois légèrement inférieures à celles obtenues vers 70° à 80°. Il est probable que la température favorise dans ce cas l'hydrolyse de



Graphique I. — Quantités d'acétylcholine libre contenues dans la suspension aqueuse éserinée de divers cerveaux de mouton en fonction de la température de chauffage.

— en abscisses, température en degré.

— en ordonnées, quantités d'acétylcholine en γ par gr.

l'acétylcholine. Signalons, par contre, que si avant le chauffage une quantité connue d'acétylcholine est ajoutée à la suspension d'organe, elle est retrouvée intégralement après chauffage à 80° pendant 3 minutes.

Nous avons adopté un temps de chauffage de 3 minutes : du fait du chauffage au bain-marie réglé entre 70 et 80°, la suspension d'organe placée dans un tube à essai n'atteignait la température du bain qu'après un minimum de 2 minutes, et par contre un chauffage plus prolongé ne libérait pas une quantité plus grande d'acétylcholine.

f) *Action de la congélation.* — GOLLWITZER-MEIER (1934) avait montré dans l'extrait aqueux éseriné de rate de bœuf et de cheval, l'existence d'un complexe libérant de l'acétylcholine

après congélation de l'extrait. Nous nous sommes demandée si le complexe thermolabile que nous avons mis en évidence dans le cerveau était également susceptible d'être décomposé aux basses températures.

Le cerveau de mouton (expériences 3781 et 3786 bis) est broyé en présence d'ésérine et refroidi brusquement avec de la neige carbonique ; après quelques minutes, on observe la congélation de l'organe. On abandonne alors à la température de laboratoire et après dégel le cerveau est repris par du liquide physiologique. Des quantités déterminées de la suspension d'organe sont ajoutées soit avant, soit après chauffage à 80°, au bain renfermant le muscle de sangsue. On n'observe aucune différence entre les deux essais.

Nous avons également réalisé la congélation du tissu cérébral en l'absence d'ésérine (expérience 3781 bis) ; aucune trace d'acétylcholine n'est alors décelable dans le cerveau congelé après retour à la température normale et chauffage à 80° ; or, nous avons vu précédemment que dans la pulpe de cerveau le complexe est conservé en l'absence d'ésérine. Il faut donc admettre que, par le fait de la congélation, l'acétylcholine est libérée du complexe et, en l'absence d'ésérine, détruite consécutivement par la cholinestérase.

D'après nos expériences, *la congélation du cerveau de mouton à — 10° provoque la destruction spontanée du complexe acétylcholinique.*

g) *Action de la dessiccation.* — Nous nous sommes demandée en outre, s'il était possible de conserver le complexe après dessiccation du cerveau. Afin d'assurer une dessiccation rapide de l'organe, le cerveau de mouton (expériences 3775-3961 bis) est broyé en présence d'ésérine et la pulpe obtenue est étalée en une couche très mince sur une plaque de verre. Celle-ci est placée sous la cloche à vide en présence d'acide sulfurique et d'anhydride phosphorique. On réalise un vide très poussé (1/10 de mm. de mercure), et il est possible d'obtenir une poudre sèche en 3 h. environ. Cette poudre est reprise par le liquide physiologique et le dosage de l'acétylcholine dans la suspension d'organe est effectué, avant et après chauffage à 80°, sur le muscle de sangsue : une même dose d'extrait provoque dans les deux cas sur le muscle une contraction identique.

Le complexe acétylcholinique est donc totalement décomposé par dessiccation du tissu cérébral.

h) *Action de l'électrolyse.* — Nous avons soumis à l'électrolyse une suspension de cerveau dans du liquide physiologique ésériné ou non ésériné. La suspension de cerveau (3 centimètres cubes par gr. d'organe) est placée dans un tube de verre de 1 centimètre de diamètre. Un fil de platine pénètre à la partie inférieure du tube et un deuxième fil de platine plonge dans le liquide à la partie supérieure. Ces fils sont reliés, l'un au pôle positif, l'autre au pôle négatif d'une série d'accumulateurs donnant une différence de potentiel de 10 volts. Pour éviter une élévation de température, un manchon contenant de l'eau froide entoure le tube d'électrolyse.

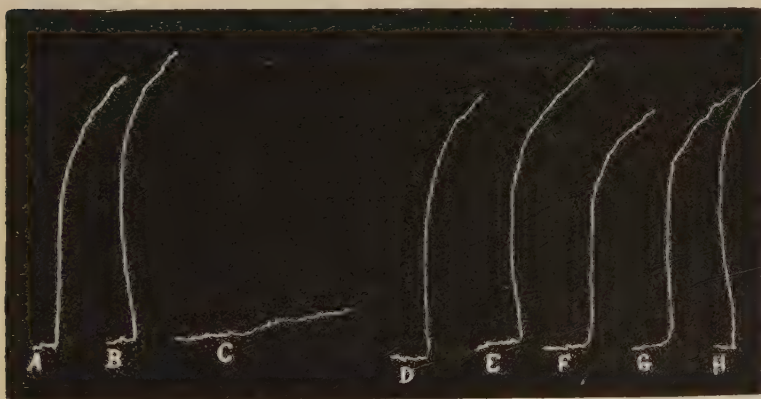
Nous donnons deux protocoles d'expériences, l'un en l'absence d'ésérine, l'autre en présence d'ésérine.

EXPÉRIENCE 3895. (*tracé 17*). — Cerveau de cobaye (poids = 3,5 grs.) :

Broyage et dilution avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000, le volume de la suspension est amené à 12 cm³.

— 6 cm³ sont soumis à l'électrolyse sous 10 volts pendant 15 minutes.

— 6 cm³ sont conservés comme témoin.



Tracé 17. — (expérience 3895).

Action sur le muscle de sangsue ésériné d'une suspension saline de cerveau de cobaye non ésériné et soumise à l'électrolyse.

en A, 0,25 gr. cerveau de cobaye témoin non ésériné et chauffé à 80° — en B, 0,5 γ d'acétylcholine — en C, 0,25 gr. cerveau de cobaye soumis à l'électrolyse et chauffé — en D, 1 gr. du même extrait — en E, 0,5 γ d'acétylcholine — en F, 0,25 gr. cerveau de cobaye témoin non ésériné et chauffé — en G, 0,45 γ d'acétylcholine — en H, 0,5 γ d'acétylcholine.

Nous avons obtenu par dosage sur le muscle de sangsue dans le cerveau soumis à l'électrolyse et chauffé à 80°, 0,5 γ d'acétylcholine par gr., et dans le cerveau témoin chauffé dans les mêmes conditions 1,75 γ d'acétylcholine par gr.

Dans cette expérience, nous avons obtenu par électrolyse une destruction de 70 p. 100 environ du complexe existant normalement dans le cerveau de cobaye.

EXPÉRIENCE 3901. — Cerveau de cobaye (poids = 3,5 grs.) :

Broyage et dilution avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ésérinée à 1/30.000, le volume de la suspension est amené à 13 cm³.

— 6 cm³ sont soumis à l'électrolyse (10 volts) pendant 20 minutes et 6 cm³ sont conservés comme témoin.

Les dosages de l'acétylcholine avant chauffage (acétylcholine libre) et après chauffage (acétylcholine totale) sont effectués sur le muscle de sangsue.

Dans le cerveau normal	{	acétylcholine libre : 1 γ par gr.
		» totale : 4 γ par gr.
Dans le cerveau soumis à l'électrolyse	{	acétylcholine libre : 1,75 γ par gr.
		» totale : 2,75 γ par gr.

En présence d'ésérine nous constatons la libération d'une partie de l'acétylcholine du complexe, l'acétylcholine libre passant de 1 γ à 1,75 γ après électrolyse. Cependant nous devons remarquer que l'acétylcholine totale est plus faible malgré la présence d'ésérine dans la fraction de substance cérébrale soumise à l'électrolyse. Il est possible que l'électrolyse favorise également l'hydrolyse de l'acétylcholine libérée. Nous n'insisterons pas davantage sur ces expériences qui nous permettent seulement d'affirmer la *possibilité d'une décomposition du complexe sous l'influence de l'électrolyse d'une suspension saline du tissu cérébral*.

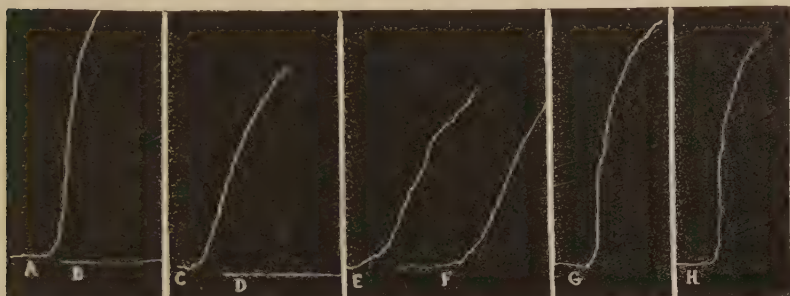
§ 2. — Etude de la stabilité du complexe en milieux aqueux et physiologique ; influence de l'ésérine

Nous avons constaté dans le précédent chapitre que le complexe, mis en évidence dans le cerveau, existait normalement sous une forme inattaquable par les estérases contenues dans l'organe. D'autre part, pratiquement pour éliminer toute destruction cholinestérasique, nous avons étudié ses propriétés en milieu cependant ésériné ; il nous reste à préciser dans quelles conditions l'ésérine est au reste nécessaire à la stabilité du complexe cérébral.

Ces expériences ont été réalisées sur le cerveau de mouton.

a) *Comparaison de la stabilité du complexe dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 ésérinée et non ésérinée.*

— Que l'existence du complexe puisse qualitativement être mise en évidence en solution physiologique, nous avons eu l'occasion de le montrer au chapitre précédent : la question se pose cepen-



Tracé 18. — (expérience 3762).

Comparaison de l'activité sur le muscle de sangsue ésériné de la suspension de cerveau de mouton dans une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ésérinée ou non ésérinée.

en A, 1 γ d'acétylcholine — en B, 2 gr. de cerveau dans sol. NaCl non ésérinée — en C, 1 gr. de cerveau dans sol. NaCl non ésérinée, chauffé à 80° — en D, 1 gr. de cerveau dans sol. NaCl non ésérinée, chauffé et mis ensuite en contact avec du sérum de cheval — en E, 2 gr. cerveau dans sol. NaCl ésérinée — en F, 0,7 γ d'acétylcholine — en G, 1 gr. cerveau dans sol. NaCl ésérinée puis chauffé — en H, 1 γ d'acétylcholine.

dant du point de vue quantitatif : la teneur du complexe est-elle identique dans la suspension en milieu physiologique, que celui-ci soit ésériné ou non ?

EXPÉRIENCE 3762. (tracé 18) :

Un cerveau de mouton (poids : 115 grs.) est divisé en 2 parties symétriques : 1°) L'une de ces moitiés de cerveau (poids : 60 grs.) est broyée *en l'absence d'ésérine* ; 10 minutes environ après le broyage on fait un prélèvement de 4 grs. de substance que l'on dilue avec 8 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ; la suspension d'organe ainsi obtenue est agitée et partagée en deux parties égales correspondant chacune à 2 grs. d'organe. L'une, ajoutée au bain renfermant le muscle de sangsue ésériné et préalablement étalonné ne provoque aucune contraction. L'autre est maintenue au bain-marie à 80° pendant 3 minutes, et une fraction correspondant à 1 gr. est dosée sur le même test ; la contraction obtenue correspond à une quantité d'acétylcholine de 0,7 γ — 1 gr. du même extrait, traité par 1 cm³ de sérum de cheval est, après 5 minutes de contact, complètement inactif sur le muscle de sangsue.

2°) L'autre moitié du cerveau (poids : 55 grs.) est broyée en pré-

sence d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000, *ésérinée* à 1/30.000 (3 cm³ de suspension d'organe correspondent à 1 gr. de l'organe frais). Une quantité égale à 2 grs. d'organe est ajoutée au bain renfermant le muscle de sangsue, la courbe obtenue est équivalente à celle provoquée par 0,7 γ de la solution étalon d'acétylcholine.

1 gr. du même extrait est chauffé à 80° pendant 3 minutes et donne, après refroidissement, sur le muscle une contraction correspondant à 1 γ d'acétylcholine.

Dans cette expérience la valeur de l'acétylcholine libre dans le cerveau de mouton *ésériné* est de 0,35 γ par gr. d'organe. Cette acétylcholine a disparu du fait de la présence d'estérase active dans la fraction non *ésérinée*. Si l'on fait la différence entre l'acétylcholine totale (1 γ par gr.) et l'acétylcholine libre (0,35 γ par gr.) contenues dans le cerveau *ésériné*, le chiffre obtenu (0,65 γ par gr.), représentant la valeur du complexe, est très voisin de celui trouvé par dosage dans l'extrait chauffé non *ésériné* (0,7 γ par gr.).

Donc si l'acétylcholine libre est détruite, en milieu salin (NaCl à 9 p. 1.000) non ésériné, le complexe y est par contre intégralement conservé.

b) *Stabilité du complexe étudiée comparativement après broyage du cerveau dans l'eau ésérinée ou non ésérinée.* — Les résultats obtenus avec la solution physiologique nous ont incité à étudier comparativement la stabilité du complexe, la suspension d'organe étant réalisée en l'absence de chlorure de sodium dans l'eau *ésérinée* ou non.

EXPÉRIENCE 3710. (*tracé 19*). — Cerveau de mouton (poids = 120 grs.):

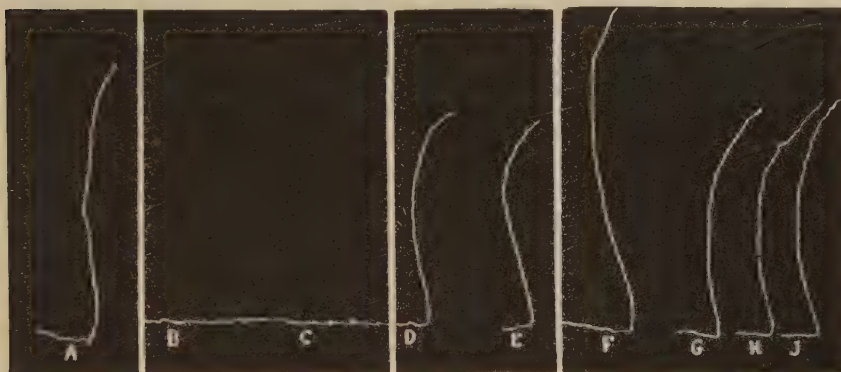
Le cerveau est partagé en deux parties symétriques. 1°) Une partie est broyée avec 2 cm³ d'eau pour 1 gr. d'organe. Une quantité de la suspension obtenue renfermant 2 gr. d'organe est essayée sur le muscle de sangsue *ésériné* et ne provoque aucune contraction ; après chauffage, cette fraction est également complètement inactive.

2°) L'autre moitié de cerveau est broyée avec un volume d'eau identique mais renfermant du sulfate d'*ésérine* à la concentration de 1/30.000. L'addition de 1 gr. d'organe au muscle de sangsue provoque une contraction égale à 0,4 γ d'acétylcholine. Après chauffage, 1 gr. d'organe renferme 0,9 γ d'acétylcholine.

Il résulte de cette expérience que si l'acétylcholine libre et le complexe peuvent être mis en évidence dans la suspension aqueuse de cerveau en présence d'*ésérine*, par contre, le même extrait en l'absence d'*ésérine* ne renferme plus aucune trace

d'acétylcholine, ni de complexe acétylcholinique susceptible de libérer de l'acétylcholine par chauffage. *Le complexe est donc instable en milieu aqueux non ésériné.*

c) *Comparaison de la stabilité du complexe en milieux aqueux et salin (NaCl à 9 p. 1.000), également ésérinés.* — Il restait enfin logiquement à vérifier si la stabilité du complexe en présence d'ésérine était de même ordre que la dilution soit faite dans de l'eau ou dans une solution de chlorure de sodium.



Tracé 19. — (expérience 3710).

Comparaison de l'activité sur le muscle de sangsue ésériné des suspensions aqueuses de cerveau de mouton, ésérinée et non ésérinée.

en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 2 gr. de cerveau en suspension aqueuse non ésérinée — en C, 2 gr. cerveau en suspension aqueuse non ésérinée après chauffage à 80° — en D, 1 gr. cerveau en suspension aqueuse ésérinée — en E, 0,4 γ d'acétylcholine — en F, 1 gr. cerveau en suspension aqueuse ésérinée après chauffage à 80° — en G, 0,4 γ d'acétylcholine — en H, 0,5 gr. cerveau ésériné après chauffage à 80° — en J, 0,45 γ d'acétylcholine.

EXPÉRIENCE 2710 bis. (tracé 20). — Cerveau de mouton partagé en 2 parties :

1° 1/2 cerveau est broyé avec 2 cm³ par gr. d'eau ésérinée à 1/30.000. Le dosage de l'acétylcholine est effectué sur 1 gr. d'organe, avant et après chauffage de la suspension, sur le muscle de sangsue.

— Avant chauffage 1 gr. d'organe renferme 0,4 γ d'acétylcholine

— Après chauffage 1 gr. d'organe renferme 0,8 γ d'acétylcholine.

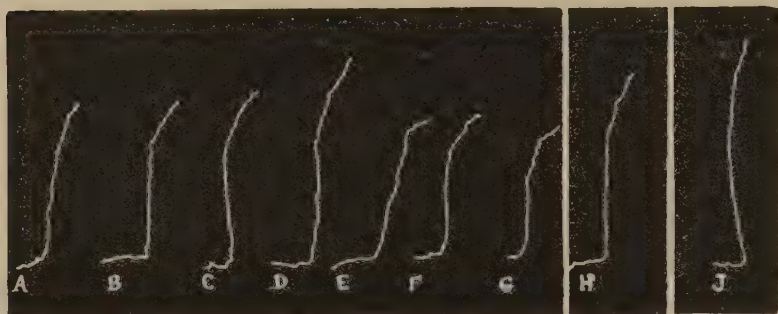
2° 1/2 cerveau est broyé avec 2 cm³ par gr. de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 ésériné à 1/30.000.

1 gr. d'organe provoque, avant chauffage, une contraction équivalente à 0,3 γ d'acétylcholine.

Après chauffage, 1 gr. renferme 0,8 à 0,9 γ d'acétylcholine.

Les résultats, tant pour l'acétylcholine libre que pour le complexe contenu dans les extraits aqueux et salins ésérinés, sont

très voisins et les légères différences observées sont facilement explicables par les erreurs de partage.



Traté 20. — (expérience 3710 bis).

Comparaison de l'activité sur le muscle de sangsue ésériné des extraits de cerveau de mouton dans l'eau et la solution de NaCl à 9 p. 1.000 également ésérinées.

en A, 0,4 γ d'acétylcholine — en B, 1 gr. cerveau en suspension aqueuse ésérinée — en C, 0,5 gr. cerveau en suspension aqueuse ésérinée après chauffage — en D, 0,5 γ d'acétylcholine — en E, 1 gr. cerveau en suspension dans la solution de NaCl ésérinée — en F et G, 0,3 γ d'acétylcholine — en H, 0,5 gr. cerveau en suspension dans la solution de NaCl ésérinée après chauffage — en J, 0,5 γ d'acétylcholine.

La stabilité du complexe est identique en milieu aqueux ésériné et en milieu salin (NaCl à 9 p. 1.000) également ésériné.

d) *Action du chlorure de sodium à différentes concentrations sur la stabilité du complexe.* — Etant donné le rôle du chlorure de sodium, nous avons été amenée à déterminer les concentrations nécessaires pour réaliser la stabilité du complexe ; nous avons adopté la technique suivante :

Le cerveau de mouton est finement broyé ; dans ces conditions, nous avons vu que l'acétylcholine que nous avons considérée comme libre disparaît rapidement et que par contre, le complexe est conservé : la pulpe obtenue sera divisée par pesées et chacune des fractions, diluée avec des solutions de chlorure de sodium de concentrations différentes.

Nous donnons le protocole de l'une de ces expériences :

EXPÉRIENCE 3768. — Cerveau de mouton (poids = 115 grs.) :

Après broyage, la pulpe est rendue bien homogène et divisée par pesée :

16 grs.	sont dilués avec	32 cm ³	de NaCl à	9	p. 1.000
16 »	»	»	»	7	»
16 »	»	»	»	4,5	»
16 »	»	»	»	3	»

— *Avant chauffage*, une fraction de chacune de ces dilutions, correspondant à 4grs. d'organe, est sans action sur le muscle de sang-sue (sensibilité = 0,25 γ d'acétylcholine).

— *Après chauffage*, 2 grs. de la suspension de cerveau dans NaCl à 9 p. 1.000 donnent une contraction de 1,5 γ d'acétylcholine. — 2 grs. de la suspension dans NaCl à 7 p. 1.000 renferment 0,8 γ d'acétylcholine. — 4 grs. de la suspension dans NaCl à 4,5 p. 1.000 renferment 0,5 γ d'acétylcholine. — 4 grs. de la suspension dans NaCl à 3 p. 1.000 sont sans action.

Nous avons remarqué d'autre part, que si le chauffage des suspensions de cerveau aux diverses concentrations indiquées est effectué quelques minutes après la dilution ou après 1 à 2 heures, les résultats sont identiques quant à la teneur en acétylcholine.

Nous groupons dans le tableau V les résultats de quelques expériences réalisées sur des cerveaux de moutons différents et avec des solutions de chlorure de sodium à diverses concentrations.

• TABLEAU V

Acétylcholine en γ par gr. libérée par chauffage à 80° dans des suspensions de cerveau de mouton plus ou moins concentrées en NaCl.

N° des Expériences	Concentrations en NaCl						
	15 p. 1000	11 p. 1000	9 p. 1000	7 p. 1000	4,5 p. 1000	3 p. 1000	2 p. 1000
3745			0,5		0,25		0
3759			0,5		0,2		
3768			0,75	0,4	0,125	0	
3778			0,6	0,25			
3786		0,5	0,5	0,25			
3787	0,25		0,25				
3984			0,45		0,2		0

De l'examen de ces résultats, il est facile de conclure que le complexe est stable, tout au moins à la dilution employée, dans des solutions de chlorure de sodium de concentrations égales ou supérieures à 9 p. 1.000. Il y a déjà, par contre, une importante destruction du complexe dans la solution à 7 p. 1.000, cette destruction est d'environ 50 p. 100. Elle atteint 75 p. 100 et même davantage dans la solution de chlorure de sodium à 4,5 p. 1.000. Dans tous les cas la destruction du complexe est immédiate et ne se poursuit pas plus avant, même si la suspension cérébrale est

abandonnée pendant une à deux heures à la température du laboratoire.

La stabilité du complexe apparaît donc dans certaines limites fonction de la concentration saline.

Le chlorure de sodium agit-il en bloquant la cholinestérase ou bien a-t-il une action propre sur la stabilité du complexe, en maintenant la concentration ionique ?

1°) *Action du chlorure de sodium à 9 p. 1.000 sur l'activité cholinestérasique de la suspension cérébrale.* — Nous avons étudié comparativement la destruction de l'acétylcholine ajoutée à la pulpe cérébrale diluée dans l'eau ou le chlorure de sodium à 9 p. 1.000 après des temps de contact plus ou moins longs.

La technique adoptée est analogue à celle décrite dans un travail antérieur (HALPERN et E. CORTEGGIANI 1936) sur l'étude de la destruction de l'acétylcholine par divers tissus :

L'organe est finement broyé avec 2 centimètres cubes d'eau par gr. et, à un volume déterminé de la suspension obtenue, on ajoute 100 γ d'acétylcholine. L'acétylcholine contenue dans cette préparation est dosée sur le muscle de sangsue éseriné au bout d'un temps bien défini, l'addition d'ésérine permettant d'arrêter instantanément la réaction d'hydrolyse. On établit ainsi en fonction de différents temps de contact le pourcentage de l'acétylcholine détruite. .

Nous donnons le protocole type de l'une de ces expériences :

EXPÉRIENCE 3814 *ter*.

Cerveau de mouton : 50 grs. de pulpe cérébrale sont dilués dans 100 cm³ d'eau ; a) à 12 cm³ de la suspension obtenue on ajoute 1 cm³ d'eau, puis 1 cm³ d'acétylcholine 1.10⁻⁴. — 30 secondes après l'addition d'acétylcholine on arrête la réaction diastasique par 1 cm³ de chlorure de sodium à 9 p. 100, éseriné à 1/5.000 (préparation I).

b) à 12 cm³ de la suspension on ajoute 1 cm³ de chlorure de sodium à 9 p. 100, puis 1 cm³ d'acétylcholine 1.10⁻⁴. — Après 30 secondes, on arrête la réaction par 1 cm³ de NaCl à 9 p. 1.000 éseriné à 1/5.000 (préparation II).

L'acétylcholine restante est dosée dans les préparations I et II sur le muscle de sangsue.

Résultats du dosage :

— Préparation I (eau) renferme 2 γ d'acétylcholine.

— Préparation II (NaCl 9 p. 1.000) renferme 4 γ d'acétylcholine.

D'après cette expérience il reste après 30 secondes, deux fois plus d'acétylcholine dans la suspension cérébrale en pré-

sence de chlorure de sodium que dans la suspension aqueuse. Nous reportons au tableau VI une série d'expériences analogues :

TABLEAU VI

Quantités d'acétylcholine en γ par gr. retrouvées après différents temps dans une suspension aqueuse ou saline de pulpe cérébrale (4 grs. de pulpe pour chaque essai — dilution = 3 cm³ par gr.).

Expériences	Acétylcholine ajoutée en γ	Temps d'hydrolyse	Acétylcholine restante	
			en milieu aqueux	en milieu NaCl 9 p 1000
3812	100	30 sec.	1,4	4
»	100	60 sec.	0,8	2
»	100	3 minutes	0	0,17
3809	500	60 sec.	1,6	4
3814 ter	100	30 sec	2	4
		5 minutes	0	0
3815	100	30 sec.	1,2	1,6

Nous n'avons pas établi les courbes de destruction de l'acétylcholine en fonction du temps dans les deux milieux, mais si un un blocage total de la cholinestérase par le chlorure de sodium à 9 p. 1.000 ne peut être envisagé, le fait de l'existence d'un retard appréciable de la destruction de l'acétylcholine par la substance cérébrale dans un tel milieu peut être affirmé.

2°) *Action de solutions de glucose à différentes concentrations.* — Nous avons essayé de remplacer le chlorure de sodium par des solutions isotoniques de glucose.

La pulpe du cerveau de mouton est fractionnée et l'on procède en même temps à des dilutions avec une solution de chlorure de sodium et avec une solution de glucose de pression osmotique correspondante. Nous avons établi les correspondances suivantes en considérant la solution de glucose comme non ionisée:

Solution de NaCl 4,5 p. 1.000	correspond à sol. de Glucose 27,7 p. 1.000
» NaCl 7	» » » 43 »
» NaCl 9	» » » 55,4 »
» NaCl 15	» » » 92 »

Nous avons d'abord vérifié que ces solutions de glucose n'avaient pas d'action inhibitrice ou sensibilisante vis-à-vis de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue.

Nous groupons nos expériences dans le tableau suivant :

TABLEAU VII

Acétylcholine en γ par gr. libérée après chauffage à 80°, comparativement dans des solutions de glucose et de chlorure de sodium de pression osmotique correspondante.

N° des expériences	Chlorure de Sodium				Glucose			
	15 p. 1000	9 p. 1000	7 p. 1000	4,5 p. 1000	92 p. 1000	55,4 p. 1000	43 p. 1000	27,7 p. 1000
3745		0,5		0,25		0,5		0,2
3781		0 65				0,6		
3786	0,5	0,4	0,25		0,5	0,5	0,25	
3787	0,25	0,25			0,2	0,3		

Le complexe cérébral est donc également stable dans des solutions de glucose et de chlorure de sodium de pression osmotique correspondante. Si la concentration s'abaisse, le complexe se détruit parallèlement dans la solution de chlorure de sodium et dans la solution correspondante de glucose.

Discussion. — La nécessité de la présence de l'ésérine en milieu aqueux, peut suggérer le rôle de la cholinestérase en tant qu'agent susceptible de libérer l'acétylcholine du complexe, puis d'hydrolyser cette acétylcholine consécutivement. Mais particulièrement frappant est le fait qu'en milieu chloruré sodique cette action de la cholinestérase ne saurait se manifester sur le complexe. Par quel mécanisme ? il venait tout d'abord à l'esprit de se demander si le chlorure de sodium n'aurait pas une influence sur l'activité cholinestérasique ; si dans quelques expériences nous avons pu noter un léger retard dans la vitesse d'hydrolyse de l'acétylcholine en présence d'une solution isotonique de chlorure de sodium, ce fait ne suffit pas à expliquer le maintien du complexe. Sans doute doit-on voir dans la liaison physico-chimique des substances protéiques avec les sels la raison d'être de la résistance qu'oppose le complexe acétylcholinique à l'attaque de la cholinestérase ; le rôle de l'isotonie, qu'elle soit réalisée avec le chlorure de sodium ou le glucose, nous apparaît un argument de plus en faveur de l'intervention d'un équilibre physico-chimique dans la stabilité du complexe.

La réalité d'un tel mécanisme nous semble d'importance puisque rendant compte de la stabilité du complexe du cerveau, « in vivo », dans les conditions physiologiques.

En résumé, nous avons étudié les propriétés de stabilité et de solubilité du complexe renfermant l'acétylcholine du cerveau sous l'influence de divers agents :

Le complexe acétylcholinique est insoluble dans l'eau et dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000 ; il est détruit par les acides, par les solvants organiques (alcool, acide trichloracétique, acétone) au même titre que par la chaleur (70°).

Le complexe est stable au-dessous de 55° et une température de 70° est nécessaire pour sa destruction totale.

Le complexe est également détruit par la congélation, la dessiccation et partiellement par l'électrolyse.

Le complexe est détruit rapidement en milieu aqueux, mais, dans ce cas, il est stabilisé par l'ésérine. Nous insistons sur l'intérêt de sa stabilité, à l'encontre de l'acétylcholine, dans le chlorure de sodium à 9 p. 1000 en l'absence d'ésérine, le fait rendant compte semble-t-il de la stabilité « in vivo » du complexe dans le cerveau. Nous attribuons à la liaison physico-chimique des substances protéïques avec les sels la résistance qu'oppose celui-ci à l'attaque de la cholinestérase dans les conditions physiologiques.

CHAPITRE V

Hypothèses sur la nature du complexe

Sa reconstitution « in vitro »

§ 1. — Hypothèses sur la nature du complexe

L'ensemble des propriétés du complexe acétylcholinique, telles que nous les avons définies, permet-il de faire quelque hypothèse sur la nature du complexe et d'éclairer le mécanisme de sa décomposition ?

a) *Liaison de l'acétylcholine avec les protides.* — La libération totale de l'acétylcholine dissimulée à une température de 70° coïncide avec la coagulation de la majeure partie des protéides du cerveau. D'autre part, les solvants organiques tels que l'alcool, l'acétone, l'acide trichloracétique, aboutissant eux aussi à une coagulation des substances protéiques, provoquent dans les mêmes proportions la décomposition du complexe. Rappelons également que l'électrolyse, accompagnée d'un phénomène de coagulation, provoque une libération tout au moins partielle de l'acétylcholine dissimulée. Autant de données qui permettent d'envisager la possibilité d'une acétylcholine liée aux protides.

Se trouve-t-on en présence d'une simple adsorption ? Il ne semble pas. On sait que l'acétylcholine est peu adsorbable : ING et WRIGHT (1932-1934), VAN OETTINGEN et BOWMAN (1933) émettent l'avis que les substances du groupe de la choline, en tant qu'ammonium quaternaires, ne présentent pas une tension superficielle susceptible de rendre compte d'un mécanisme de fixation par adsorption.

Il est plus vraisemblable, suivant l'hypothèse que formule CLARK (1937) quant à la fixation de l'acétylcholine sur le protoplasme cellulaire, que cette substance, base forte, est fixée par combinaison du groupe ammonium substitué avec les radicaux carboxyle des protéides.

La stabilisation du complexe relève et du *pH* et de la présence de certains électrolytes, du chlorure de sodium en particulier, comme nous avons eu l'occasion de le montrer en étudiant

ses propriétés ; ce fait n'est pas pour surprendre, on sait que la séparation des électrolytes d'une solution d'albumine en détermine la précipitation.

b) *Liaison de l'acétylcholine avec les lipoprotéides.* — L'existence d'une liaison de l'acétylcholine avec un composé lipoprotéidique se présente également à l'esprit. Récemment, A. PETRUNKINA et M. PETRUNKINE (1935) signalaient la présence dans le cerveau d'un colloïde lipoprotéidique, à point isoélectrique de 4,4 — 4,6, susceptible de fixer une quantité considérable de base au pH de l'organisme. MACHEBŒUF et SANDOR (1932) ont insisté sur la résistance particulière à l'extraction par l'éther des lipides liés aux protides et de la nécessité de l'alcool pour rompre la liaison lipoprotéidique. Nous avons vu, tout au moins pour le cerveau de mouton et de cobaye, que si les extraits alcooliques ou acétoniques sont traités par l'éther pour éliminer les lipides, il n'y a pas d'acétylcholine entraînée dans l'extrait éthéré (p. 60). On peut donc supposer dans ce cas que l'alcool, l'acétone, en détruisant le composé lipoprotéidique, au cas où il existerait, libèrent l'acétylcholine qui s'y trouverait fixée.

Par contre les expériences récentes de LÆWI (1937, a b), sur le cerveau de grenouille, inciteraient à penser que l'acétylcholine reste fixée sur la fraction lipidique du complexe lipoprotéidique ; cet auteur, après avoir mis en évidence dans le cerveau de grenouille l'existence d'un complexe susceptible de présenter une activité acétylcholinique sur le cœur de grenouille après traitement par l'alcool, insiste sur le fait que cette activité disparaît si l'extrait alcoolique est soumis à un traitement à l'éther ; cette activité peut d'ailleurs être retrouvée dans le résidu de l'extrait éthéré après élimination de l'éther. Après avoir constaté que l'acétylcholine dissimulée dans le cerveau ne peut être extraite directement par l'éther, LÆWI suggère l'hypothèse d'une liaison de l'acétylcholine non seulement avec les lipides mais aussi avec les protides, ce qui expliquerait la nécessité d'un passage par l'alcool ou les solvants acides, pour rendre soluble dans l'éther une acétylcholine libérée de sa liaison protidique et qui resterait liée seulement aux lipides.

Si cette hypothèse garde toute sa valeur quand il s'agit du complexe du cerveau de grenouille, aucun fait expérimental ne permet de s'y rallier pour expliquer la nature du complexe dans

le cerveau des mammifères, le rôle de l'éther étudié dans ce cas, par nous-mêmes étant tout à fait différent.

En conclusion donc, bien que nous ayons nous-mêmes envisagé l'existence d'une liaison lipoprotéidique de l'acétylcholine dans le cerveau de mammifères, aucune donnée ne nous permet de l'affirmer, ou par contre, d'en rejeter l'hypothèse. N'est-il pas permis après tout d'envisager pour l'acétylcholine, un support différent suivant l'espèce animale.

§ 2. — Reconstitution du complexe « in vitro »

Il nous a été donné avec J. GAUTRELET, A. CARAYON et A. KASWIN, (1937) de montrer la possibilité d'opérer la reconstitution du complexe par addition d'acétylcholine à la substance cérébrale.

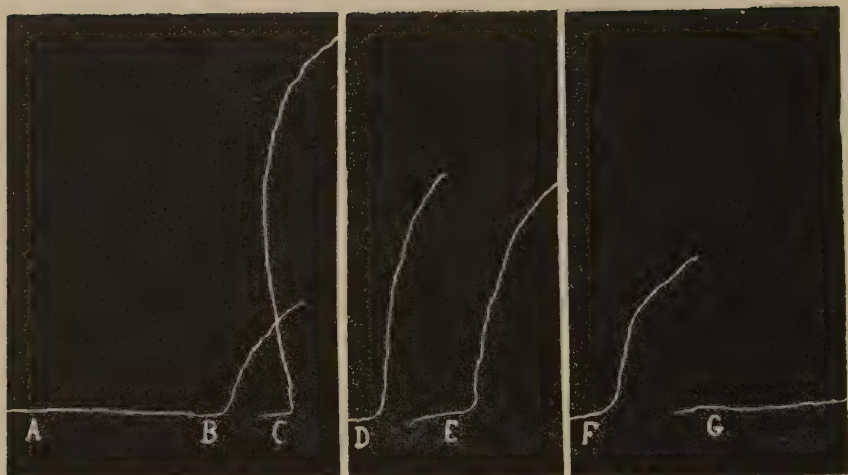
a) *Technique.* — Nous avons adopté la technique suivante :

Le cerveau de mouton est broyé finement et dilué avec 1, 5 à 2 centimètres cubes d'eau par gr. d'organe. Cette suspension, comme nous l'avons constaté, soit avant, soit après chauffage à 80° ne renferme ni acétylcholine libre ni complexe. Si dans ces conditions, on ajoute à un volume de la suspension correspondant à 4 grs. d'organe, une quantité connue de chlorure d'acétylcholine (100 à 200 γ), on en constate la disparition à peu près totale au bout de 1 à 2 minutes, cette destruction étant due à l'activité cholinestérasique de l'organe. Mais, si l'on arrête la réaction diastatique par addition de sulfate d'ésérine alors que reste encore une petite quantité d'acétylcholine libre, on peut mettre en évidence, après chauffage de la suspension, une quantité d'acétylcholine nettement supérieure ; par contre, si l'ésérine est ajoutée tardivement, alors que le milieu ne renferme plus d'acétylcholine décelable, il n'est plus possible en général de mettre en évidence par chauffage une libération d'acétylcholine.

EXPÉRIENCE 3988. (*tracé 21*) :

Le cerveau de mouton est broyé en l'absence d'ésérine. 50 grs. de la pulpe obtenue sont dilués avec de l'eau afin d'obtenir un volume final de 150 cm³ de suspension cérébrale. On vérifie tout d'abord que 2 grs. d'organe (6 cm³ de la suspension) après chauffage sont sans action sur le muscle de sangsue ésériné.

1°) 12 cm³ de la suspension sont additionnés de 1 cm³ d'acétylcholine 2.10⁻⁴ en agitant constamment ; après 30 secondes exactement on



Tracé 21. — (expérience 3988).

Muscle de sangsue éseriné — Reconstitution du complexe après addition d'acétylcholine à la suspension aqueuse de cerveau de mouton.

en A, 2 gr. de cerveau en suspension aqueuse après chauffage à 80° — en B, 2 gr. de cerveau après 1 minute de contact avec l'acétylcholine — en C, 2 gr. de la même préparation après chauffage à 80° — en D, 1 gr. de la même préparation chauffée — en E, 0,5 γ d'acétylcholine — en F, 0,25 γ d'acétylcholine — en G, 2 gr. de cerveau après 3 minutes de contact avec l'acétylcholine et chauffage à 80°.

ajoute 2 cm³ d'éserine à 1.10⁻⁴. L'acétylcholine libre et totale sont alors dosées sur le muscle de sangsue :

acétylcholine libre	= 1,8 γ par gr.
» totale	= 2,2 γ par gr.
» dissimulée	= 0,4 γ par gr.

2°) On réalise la même expérience en ajoutant l'éserine après une minute :

acétylcholine libre	= 0,1 γ par gr.
» totale	= 0,5 γ par gr.
» dissimulée	= 0,4 γ par gr.

3°) Addition d'éserine après 2 minutes :

acétylcholine libre	= 0 (< 0,1 γ pour 2 grs.)
» totale	= 0,4 γ par gr.
» dissimulée	= 0,4 γ par gr. environ

4°) Addition d'éserine après 3 minutes :

acétylcholine libre	= 0 (< 0,1 γ pour 2 grs.)
» totale	= 0 (< 0,1 γ pour 2 grs.)

Il ressort nettement de ce protocole que l'action de la cholinestérase étant supprimée 30 secondes à 2 minutes après la mise en contact de l'acétylcholine avec la pulpe cérébrale, l'acétylcholine dissimulée apparue est de l'ordre de 0,4 γ par gr. d'organe. Par contre, après 3 minutes, alors que toute trace d'acétylcholine

ajoutée primitivement a disparue, il n'est plus possible de mettre en évidence la formation du complexe. Dans une série d'expériences du même ordre nous avons obtenu des résultats analogues, permettant d'affirmer dans les conditions précisées *l'obtention d'une forme dissimulée de l'acétylcholine*.

On nous permettra d'insister sur la disparition constante dans les conditions expérimentales précédentes du complexe néoformé, on ne peut voir là qu'un argument permettant de le rapprocher, quant à sa stabilité, du complexe mis en évidence par nous dans le cerveau ; ce dernier était également instable en milieu aqueux. Nous avons par contre insisté précédemment sur la stabilité du complexe cérébral en présence d'une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000. Est-il possible de remplacer l'ésérine par le chlorure de sodium pour arrêter la décomposition du complexe obtenu dans les conditions précédentes ? Nous donnons un protocole type de nos expériences.

EXPÉRIENCE 3788. — Cerveau de mouton :

50 grs. de pulpe de cerveau sont dilués à 125 cm³ avec de l'eau. — 10 cm³ de la suspension sont additionnés de 1 cm³ d'acétylcholine 1.10⁻⁴ ; après 1 minute on ajoute 1 cm³ d'ésérine 1.10⁻⁴, et l'acétylcholine est dosée sur le muscle de sangsue ésériné :

acétylcholine libre	= 0,1 γ par gr.
» totale	= 0,5 γ par gr.
» dissimulée	= 0,4 γ par gr.

— A 10 cm³ de la suspension d'organe additionnés comme précédemment de 1 cm³ d'acétylcholine 1.10⁻⁴, on ajoute après 1 minute 1 cm³ de chlorure de sodium à 9 p. 100. L'acétylcholine libre et totale est dosée après 10 minutes environ sur le muscle de sangsue ésériné :

Acétylcholine libre	= 0 (< 0,1 γ pour 2 grs.)
» totale	= 0,4 γ par gr.
» dissimulée	= 0,4 γ par gr.

D'après cette expérience et des expériences similaires, il est possible de stabiliser le complexe ainsi reconstitué aussi bien par le chlorure de sodium que précédemment par l'ésérine, la concentration finale de la suspension en chlorure de sodium étant amenée à 9 p. 1.000 environ.

Il semble donc bien que nous soyons en présence d'un complexe analogue à celui que nous avons mis en évidence normalement dans le cerveau.

Nous avons cherché à préciser quelques faits susceptibles de rendre compte du mécanisme de formation de ce complexe.

b) *Influence du temps de contact de l'acétylcholine ajoutée sur la formation du complexe.* — Comme le montre l'expérience 3988, nous avons dosé l'acétylcholine libre et totale après arrêt de la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine par l'ésérine, à des temps variables. Il est aisé de constater dans ce cas que les quantités de complexe formé, 30 secondes, 1 minute et 2 minutes après l'addition d'acétylcholine à la suspension cérébrale, sont de même ordre. Mais nous ferons remarquer qu'il n'est pas possible, par cette méthode, d'évaluer avec une approximation suffisante la valeur du complexe, après arrêt de sa destruction par l'ésérine, dans les premières secondes qui suivent l'addition de l'acétylcholine ; car les quantités d'acétylcholine libre, alors très grandes, nécessitent l'essai sur la sangsue de petites doses de la préparation ; par suite, la différence entre les extraits chauffés et non chauffés donnant la valeur du complexe est très faible et de l'ordre de l'approximation habituelle des dosages de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue.

Cependant, la valeur du complexe apparaît à peu près stable dans l'intervalle de temps où la quantité faible d'acétylcholine libre permet un dosage.

c) *Influence des quantités d'acétylcholine ajoutées à la suspension cérébrale sur la formation du complexe.* — Est-il possible d'opérer une reconstitution plus ou moins importante du complexe acétylcholinique en ajoutant des quantités croissantes d'acétylcholine à la suspension cérébrale ?

Il résulte de nos expériences qu'il est nécessaire, pour obtenir une reconstitution notable du complexe, d'ajouter des doses suffisantes d'acétylcholine. Dans quelques expériences avec 3 à 5 γ d'acétylcholine par gramme d'organe, nous avons pu obtenir avec le cerveau de mouton la formation d'un complexe libérant par chauffage 0,1 γ par gramme d'acétylcholine. Mais en général, il faut ajouter 10, 25 et même 50 γ d'acétylcholine par gramme pour obtenir une reconstitution appréciable du complexe (libération de 0,4 γ par gramme après chauffage). Avec 125 γ , il nous a été possible de mettre en évidence dans 1 gr. de suspension d'organe un complexe libérant par chauffage des quantités d'acétylcholine de 1 γ . Si les quantités d'acétylcholine ajoutée atteignent 250 γ par gramme d'organe, la quantité de complexe formée ne semble pas s'accroître. Nous n'avons pas utilisé de doses plus élevées d'acétylcholine ; en effet pour les

doses supérieures, la choline libérée par hydrolyse de l'acétylcholine peut par elle-même agir sur la sangsue et fausser le dosage.

Nous signalerons à ce propos que par addition de fortes doses d'acétylcholine, en général supérieures à 50 γ par gr. d'organe, nous avons constaté qu'il n'était plus nécessaire pour conserver le complexe d'ajouter soit l'ésérine soit le chlorure de sodium à concentration convenable, le complexe se maintenant dans ces conditions, même lorsque l'acétylcholine libre a disparue. Nous supposons que la choline provenant de l'hydrolyse de l'acétylcholine ajoutée, est susceptible de stabiliser le complexe au même titre que l'ésérine ou le chlorure de sodium.

Nous avons signalé, par ailleurs, avec J. GAUTRELET, A. KASWIN et A. SERFATY (1936), en utilisant le muscle de sangsue comme réactif, que la choline à certaines doses provoquait une inhibition marquée de la cholinestérase du sérum, et E. KAHANE et J. LÉVY (1936 c) ont également mis le fait en évidence par la méthode chimique. Quoi qu'il en soit, la valeur du complexe néoformé est en rapport, dans certaines limites, avec la quantité d'acétylcholine ajoutée à la suspension de cerveau sans qu'il nous ait été donné toutefois d'établir un rapport quantitatif.

d) *Reconstitution du complexe en présence d'ésérine.* — Doit-on voir dans la reconstitution du complexe, un phénomène diastasique ? En particulier la cholinestérase joue-t-elle un rôle dans la reconstitution du complexe « in vitro » ? Telle est la première question que nous nous sommes posée.

Rappelons que AMMON et KWIATKOWSKI (1934) ont mis en évidence une synthèse de l'acétylcholine sous l'influence de la cholinestérase dans une macération d'intestin additionnée de choline et d'acide acétique, cette synthèse ne se produisant pas en présence d'ésérine.

Il nous a semblé, bien qu'il s'agisse-là de la synthèse de l'acétylcholine elle-même et non de celle d'un complexe — les auteurs ne l'ayant pas envisagée — devoir rappeler ces faits avant de rechercher, dans le même sens, si l'ésérine est susceptible d'empêcher une reconstitution du complexe.

L'addition de quantités importantes d'acétylcholine étant nécessaire, on l'a vu, pour obtenir la formation d'une quantité appréciable de complexe, il ne peut être envisagé de procéder à un dosage du complexe en présence de telles doses d'acétylcho-

line maintenues par l'ésérine. L'élimination de l'acétylcholine s'imposait : nous avons procédé à des lavages répétés avec de l'eau ésérinée par centrifugations et décantations, afin d'entraîner la majeure partie de l'acétylcholine ajoutée.

EXPÉRIENCE 3813. (*tracé 22*). — Cerveau de mouton :

16 grs. de pulpe cérébrale non ésérinée sont dilués avec de l'eau amenant le volume de la suspension d'organe à 40 cm³.

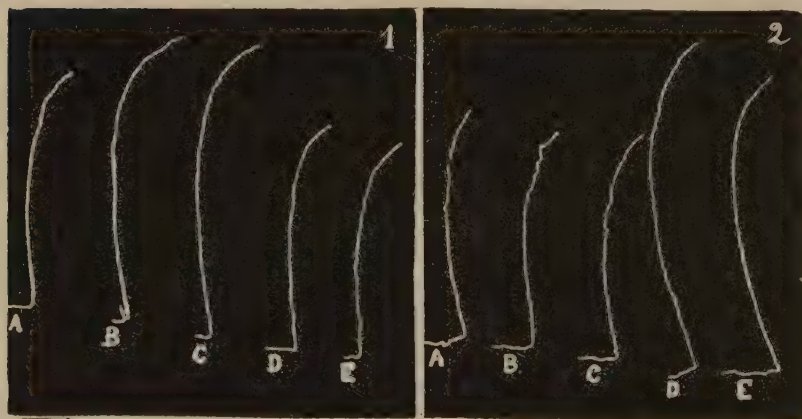
1°) 20 cm³ de la suspension sont additionnés de 1 cm³ d'eau puis de 0,5 cm³ d'acétylcholine 2.10⁻³ ; après une minute on y ajoute 1 cm³ d'ésérine à 1/5.000.

Dosage sur le muscle de sangsue :

acétylcholine libre	= 1,5 γ par gr.
» totale	= 2 γ par gr.
» dissimulée	= 0,5 γ par gr.

2°) 20 cm³ de la suspension sont additionnés de 1 cm³ d'ésérine 1/5.000 puis de 0,5 cm³ d'acétylcholine 2.10⁻³. Après quelques minutes on ajoute 20 cm³ de chlorure de sodium ésériné à 1/40.000 et on procède à la centrifugation. Après décantation, on répète 2 fois le même traitement. Le résidu final est recueilli, et les quantités d'acétylcholine libre et totale sont dosées sur le muscle de sangsue :

acétylcholine libre	= 1 γ par gr.
» totale	= 1,8 γ par gr.
» dissimulée	= 0,8 γ par gr.



Tracé 22. — (expérience 3813).

Muscle de sangsue ésériné. — Reconstitution du complexe avec la suspension saline de cerveau ésérinée ou non ésérinée.

1. — *en l'absence d'ésérine*. — en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 0,5 gr. cerveau 1 minute après addition d'acétylcholine — en C, 0,75 γ d'acétylcholine — en D, 0,25 gr. cerveau chauffé à 80° 1 minute après addition d'acétylcholine — en E, 0,5 γ d'acétylcholine.

2. — *en présence d'ésérine*. — en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 0,5 gr. cerveau additionné d'acétylcholine et soumis à des lavages et centrifugations — en C, 0,5 γ d'acétylcholine — en D, 0,5 gr. cerveau même préparation et chauffé à 80° — en E, 0,9 γ d'acétylcholine.

Dans cette expérience et dans quelques expériences analogues (3815 bis, 3814, 3810) nous avons mis en évidence la *reconstitution du complexe en présence d'ésérine*. L'intervention de la cholinestérase ne semble donc pas devoir être envisagée, ce qui ne saurait, du reste, éliminer celle d'un autre ferment.

e) *Essai de formation d'un complexe acétylcholinique par addition d'acétylcholine à des organes autres que le cerveau.* — Cette formation d'un complexe susceptible de libérer l'acétylcholine par la chaleur est-elle propre à la substance cérébrale ? Il nous sera donné dans le chapitre suivant, au cours de l'inventaire de la présence du complexe, tel que nous l'avons effectué dans nombre d'organes, de constater que l'intestin est particulièrement riche lui aussi en complexe acétylcholinique.

Bien que ce travail porte avant tout sur le complexe cérébral, il semble cependant important de signaler la reconstitution du complexe, telle que nous l'avons obtenue, de l'intestin de cobaye, par addition d'acétylcholine à la macération intestinale.

EXPÉRIENCE 3753 :

Cobaye à jeun depuis 48 heures. — Après saignée de l'animal l'intestin grêle est prélevé et broyé finement.

— 2 grs. sont dilués avec de l'eau amenant le volume de la suspension à 8 cm³.

— 1 cm³ de cette suspension (1/4 gr.) est sans action sur le muscle de sangsue ésériné et après chauffage donne une courbe correspondant à 0,4 γ d'acétylcholine.

— 2 cm³ (1/2 gr.) sont additionnés de 2 γ d'acétylcholine ; après 45 secondes on ajoute 1 cm³ d'ésérine 1.10^{-4} . Les essais sur le muscle de sangsue donnent :

acétylcholine libre : trace ($< 0,1$ γ pour 1/4 gr.).

acétylcholine totale : 1,2 γ pour 1/4 gr.

acétylcholine dissimulée : 1,2 γ pour 1/4 gr.

Nous remarquons que dans l'intestin de cobaye il ne nous a pas été possible de détruire complètement le complexe par l'eau (nous insisterons d'ailleurs plus longuement sur ce fait au chapitre suivant) ; cependant l'expérience 3753 est suggestive, car elle souligne la possibilité de reconstituer le complexe acétylcholinique de l'intestin partiellement détruit par l'eau.

On pouvait se demander si, par contre, avec un organe tel que le foie, dans lequel nous n'avons jamais caractérisé le complexe acétylcholinique, il était loisible d'obtenir, par addition d'acétylcholine, une dissimulation partielle de celle-ci. Ces expériences ont été faites sur le foie de cobaye et de rat.

EXPÉRIENCE 3822 :

Le foie de rat est broyé et dilué avec 2 cm³ d'eau par gr. d'organe. Un volume de suspension correspondant à 4 gr. d'organe est additionné de 500 γ d'acétylcholine. Après 10 minutes, la réaction d'hydrolyse est arrêtée par 2 cm³ d'ésérine à 1.10⁻⁴ et le dosage de l'acétylcholine est effectué sur le muscle de sangsue, avant et après chauffage :

acétylcholine libre = 1,25 γ par gr.

acétylcholine totale = 1,25 γ par gr.

Dans cette expérience, plusieurs fois répétée, tant sur le foie de rat que sur celui de cobaye (3822 bis, 3823, 3703), *il ne nous a pas été possible de mettre en évidence la formation du complexe* par addition d'acétylcholine à cet organe.

La question se pose, et elle est d'importance : la reconstitution du complexe est-elle limitée aux organes renfermant normalement le complexe acétylcholinique ? Une telle conclusion semblerait découler des données positives obtenues avec le cerveau et l'intestin à l'exclusion du foie. Des recherches systématisées s'imposent avec d'autres organes avant qu'il ne nous soit cependant permis de généraliser.

D'ores et déjà une certaine spécificité d'organe étant envisagée pour la reconstitution du complexe, il était permis de penser que celui-ci ne saurait être considéré comme le résultat d'une banale adsorption de l'acétylcholine par l'organe avec lequel elle est mise en contact. Nous avons recherché cependant sur une albumine telle que la *caséine*, considérée comme présentant un pouvoir adsorbant marqué l'effet de l'addition d'acétylcholine.

EXPÉRIENCE 3819 *ter* :

8 grs. de caséine dilués dans 16 cm³ d'eau sont additionnés de 1 mgr. d'acétylcholine. On procède à des centrifugations et des décantations après lavages répétés avec de l'eau ésérinée à 1/40.000 afin d'éliminer l'acétylcholine : le résidu est repris par l'eau ésérinée et la suspension obtenue est dosée, avant et après chauffage, sur le muscle de sangsue.

Résultats du dosage :

acétylcholine libre = 0,4 γ par gr.

acétylcholine totale = 0,4 γ par r.

Il n'est donc *pas possible de réaliser la fixation de l'acétylcholine par la caséine* dans les conditions précédemment définies pour la reconstitution du complexe du cerveau.

En résumé, nous formulons quelques hypothèses sur la nature du complexe acétylcholinique : nous basons l'hypothèse d'un support protéidique sur le fait que la libération d'acétylcholine du complexe est effectuée après action des divers réactifs provoquant la précipitation des substances protéidiques.

D'autre part, bien que nous ayons envisagé également l'hypothèse d'une liaison lipoprotéidique de l'acétylcholine, nous ne saurions affirmer l'existence d'une telle liaison, le fractionnement par l'éther après extraction alcoolique ne nous ayant pas permis de prouver une liaison de l'acétylcholine avec les lipides.

D'autre part, il nous a été donné d'effectuer la reconstitution du complexe par addition d'acétylcholine à la suspension de cerveau. Celle-ci peut être réalisée aussi bien en présence qu'en l'absence d'ésérine. Nous insistons sur le fait qu'elle ne semble pouvoir être opérée qu'en présence d'organes, tels le cerveau et l'intestin, qui, à l'encontre du foie, renferment normalement le complexe. Nous voyons là un argument en faveur d'une véritable synthèse et non d'une adsorption ; nous n'avons pu, au reste, fixer l'acétylcholine sur la caséïne dans les conditions où nous opérons normalement.

CHAPITRE VI

Existence d'un complexe acétylcholinique dans divers organes de Vertébrés et d'Invertébrés

Le complexe libérant l'acétylcholine, notamment sous l'influence de la chaleur, se rencontre-t-il uniquement dans le cerveau des mammifères où nous l'avons précédemment caractérisé? Il nous a semblé intéressant de le rechercher dans divers organes de Vertébrés et d'Invertébrés, en nous limitant le plus souvent pour cette étude à la caractérisation et au dosage pour chaque organe de l'acétylcholine « *libre* » c'est-à-dire de l'acétylcholine contenue dans la suspension aqueuse éserinée et de l'acétylcholine « *totale* » correspondant à la quantité décelable après chauffage de cette même suspension à 80°. Dans quelques cas, intestin de cobaye et ganglions nerveux d'*Octopus* où les quantités de complexe acétylcholinique se sont révélées particulièrement importantes, nous avons montré que ce complexe présentait quelques propriétés analogues à celles du cerveau de mouton.

On voudra bien, pour ce qui est des chiffres d'acétylcholine trouvés antérieurement dans les différents organes par les auteurs, se reporter au tableau I (Ch. II). Ces chiffres obtenus pour la plupart par extraction à l'aide des solvants organiques se confondent à nos yeux avec l'acétylcholine totale.

§ 1. — Existence du complexe dans les organes des Vertébrés

Dans un travail antérieur (E. CORTEGGIANI, 1937 c) nous avons signalé l'existence d'un tel complexe dans divers organes de vertébrés.

a) *Système nerveux*. — Amplifiant tout d'abord les données relatives au cerveau des mammifères (Tableau II, Chapitre III) nous avons mis en évidence le complexe dans le *cerveau* de bœuf, de chien, de chat, de lapin, de hérisson. Un complexe analogue existe dans le cerveau d'oiseau (pigeon), de batracien (grenouille), de reptile (tortue, lézard) et de poisson (*Scyllium canicula*, *Raia clavata*, *Labrus bergylla*). Tandis que la quantité d'acétylcholine libre est de l'ordre de 0,2 à 1 γ par gr. suivant l'animal, elle double ou triple après chauffage.

Signalons que, chez les *jeunes animaux*, la teneur du cerveau, tant en acétylcholine libre qu'en complexe, est nettement plus importante. Nous avons comparé les chiffres obtenus avec le cerveau de jeunes chats de 4 à 12 jours et de chiens de 2 semaines avec ceux que nous avons établis dans des conditions identiques pour les animaux adultes : les quantités d'acétylcholine libre et d'acétylcholine dissimulée sont 2 à 3 fois plus grandes chez le jeune animal. Cette observation peut être rapprochée du fait que la substance grise du cerveau a une teneur beaucoup plus grande en acétylcholine libre et dissimulée que la substance blanche (Cf. Tableau III, Chap. III) et que le rapport de la substance grise à la substance blanche est plus grand chez les jeunes animaux que chez les animaux adultes.

Nous avons étendu ces recherches au système nerveux en général et nous avons constaté la présence du complexe dans la *moelle* (chat, cobaye, rat). Dans les *nerfs* vago-sympathiques et sciatiques du chien et dans le ganglion cervical supérieur du même animal, les résultats n'ont pas été constants et des dosages répétés ne nous permettent pas, vu les difficultés pour obtenir une suspension homogène par broyage, d'affirmer les valeurs importantes que nous avons signalées antérieurement (E. CORTEGGIANI, 1937 c).

b) *Intestin*. — L'intestin étant généralement riche en acétylcholine, la recherche du complexe dans cet organe s'imposait. Nous l'avons recherché dans l'intestin grêle de divers animaux (cobaye, chien, chat, lapin, hérisson, pigeon, tortue), après que l'organe avait été soumis à deux lavages avec du liquide physiologique afin d'éliminer toute trace d'acétylcholine d'origine exogène. Ces lavages sont effectués très rapidement, mais il est

cependant possible qu'une partie de l'acétylcholine libre tout au moins soit entraînée. Nous devons donc penser que les quantités trouvées sont sans doute inférieures à celles contenues normalement dans l'organe, Nous avons mis en évidence, de façon constante, l'acétylcholine sous forme libre et sous forme de complexe susceptible de la libérer à une température de 80° , dans l'intestin grêle de ces divers animaux. Dans l'intestin de lézard et de grenouille, les quantités d'acétylcholine très faibles mises en évidence ($0,1 \gamma$ par gr.) ne nous permettent pas d'affirmer la présence de complexe.

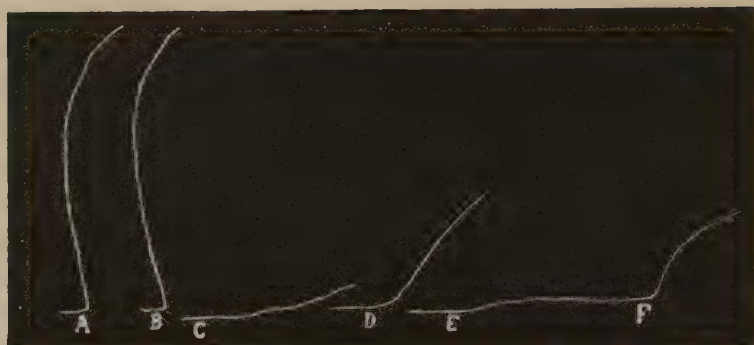
Si en général l'intestin grêle des mammifères renferme 2 à 4γ d'acétylcholine par gr. sous forme de complexe, l'intestin de hérisson s'est montré nettement plus riche : 8γ d'acétylcholine par gr. dans une moyenne de 5 expériences. Remarquons, dans le cas des jeunes animaux (chat et chien), que le fait signalé ci-dessus pour le cerveau s'observe également pour l'intestiniin : chez ceux-ci l'intestin est environ deux fois plus riche en acétylcholine que celui des animaux adultes.

Nous avons étudié plus particulièrement l'intestin de cobaye, et nous avons recherché si le complexe mis en évidence dans cet organe présentait des propriétés analogues à celles du complexe du cerveau de mouton. Nous avons comparé en particulier sa stabilité en milieu aqueux et en milieu chloruré sodique à 9 p. 1.000.

EXPÉRIENCE 3747 (*tracé 23*) : Cobaye à jeun depuis 3 jours :

Le cobaye est décapité et l'intestin grêle est prélevé immédiatement. On procède à un lavage rapide avec une solution de NaCl à 9 p. 1.000. L'organe est broyé — 1 gr. de la pulpe obtenue est dilué avec 2 cm^3 d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000. Après 15 minutes, l'essai d'un volume de la suspension, renfermant 0,25 gr. d'intestin, sur le muscle de sangsue éseriné, est sans action ; par contre, après chauffage à 80° , la même dose donne une contraction correspondant à 1γ d'acétylcholine.

D'autre part, 1 gr. de la pulpe d'intestin est additionné de 3 cm^3 d'eau ; après 15 minutes, 0,25 gr. de l'organe ainsi traité est sans action sur le muscle de sangsue et après chauffage de la même dose, on ne peut déceler que $0,3 \gamma$ d'acétylcholine. Cette activité disparaît si l'extrait chauffé est traité après refroidissement par 1 cm^3 de sérum de cheval.



Tracé 23. — (expérience 3747).

Muscle de sangsue éseriné. — Action d'une suspension saline (NaCl à 9 p. 1000) et aqueuse d'intestin de cobaye.

en A, 0,25 gr. intestin de cobaye en suspension saline après chauffage à 80° — en B, 1 γ d'acétylcholine — en C, 0,25 gr. même préparation avant chauffage — en D, 0,25 gr. intestin de cobaye en suspension aqueuse et chauffé à 80° — en E, même préparation chauffée et traitée par le sérum de cheval — en F, 0,3 γ d'acétylcholine.

Si dans cette expérience la quantité d'acétylcholine dissimulée en présence de chlorure de sodium est de 4 γ par gr., elle est encore dans la suspension aqueuse de 1,2 γ par gr. La destruction du complexe par l'eau n'est donc pas totale comme il nous a été donné de le constater pour le cerveau dans des conditions analogues. Il ne semble pas cependant que l'on doive *a priori* envisager dans l'intestin l'existence d'un complexe d'une nature différente de celui du cerveau. Il est possible en effet, que la choline, existant en grande quantité dans l'intestin, agisse en limitant la destruction de ce complexe.

c) *Estomac*. — Les mêmes précautions que pour l'intestin ont été prises pour le lavage de l'organe. Nous avons mis en évidence le complexe dans l'estomac de mammifère (chien, cobaye, hérisson) ainsi que dans celui de grenouille et de tortue.

Enfin, chez les poissons (*Raia clavata* et *Labrus bergylta*) nous avons recherché l'acétylcholine et le complexe acétylcholinique dans la muqueuse de l'estomac. Dans ces conditions, tandis que la teneur en acétylcholine libre est de 0,5 γ par gr., la teneur en acétylcholine totale est de 1 γ par gr. ; il est donc possible également de caractériser un complexe acétylcholinique dans l'estomac de ces animaux.

d) *Glandes sous-maxillaires*. — Nous avons recherché le complexe dans les glandes sous-maxillaires de chien et de chat. La viscosité de la suspension aqueuse de ces organes rend difficile le dosage sur le muscle de sangsue ; cependant, lorsque les sangsues présentaient une sensibilité suffisante, en utilisant une suspension d'organe plus diluée (10 centimètres cubes d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000 ésérinée pour 1 gr. d'organe), il nous a été possible de mettre en évidence l'existence, de façon constante, de quantités notables d'acétylcholine libre (0,3 à 1 γ par gr.) et de complexe (0,7 à 3 γ par gr.) dans les glandes sous-maxillaires.

e) *Pancréas*. — Dans la suspension aqueuse de pancréas de cobaye, de chien et de chat, nous avons toujours trouvé des quantités d'acétylcholine facilement décelables sur le muscle de sangsue ésériné. Ces quantités, de 0,1 à 0,2 γ par gr. chez le cobaye et le chien, sont beaucoup plus grandes chez le chat et peuvent atteindre 4 γ par gramme. Cependant, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence l'existence d'un complexe acétylcholinique chez le chien et le cobaye. Par contre, nous signalons sa présence, de façon constante, chez le hérisson, et dans deux cas sur six chez le chat.

Le pancréas de pigeon, qui renferme 1,2 à 1,5 γ d'acétylcholine libre par gr. ne contient apparemment pas de complexe. Pas davantage le pancréas d'un poisson (*Raia clavata*), dans lequel nous avons caractérisé et dosé jusqu'à 2 γ par gramme d'acétylcholine dans l'extrait aqueux ésériné.

On peut se demander si, dans le cas du pancréas, il n'existerait pas un complexe d'une labilité telle qu'il ne pourrait être maintenu dans le temps de l'expérience.

f) *Cœur*. — Nos expériences ont porté sur le cœur de chien, de chat, de cobaye. La suspension aqueuse ésérinée de cet organe renferme pour les différentes espèces animales une quantité notable d'acétylcholine, mais le chauffage ne permet pas d'y révéler une nouvelle libération de cette substance. Donc, d'après nos expériences, le complexe acétylcholinique n'existerait pas dans le cœur ; si ce fait, que nous avons d'ailleurs signalé dans un travail antérieur, (E. CORTEGGIANI, 1937 c) apparaît en opposition avec les observations de BEZNAK (1934), montrant la présence d'un précurseur de l'acétylcholine dans le cœur de grenouille,

des expériences récentes de LÆWI (1937 b) viennent au reste le confirmer en constatant que des quantités d'acétylcholine identiques sont libérées dans l'extraction de ce même organe, par la solution de Ringer ésérinée et par l'alcool.

g) *Surrénales*. — Si dans les surrénales de cobaye, de chat et de chien nous avons pu caractériser et doser l'acétylcholine libre, le complexe acétylcholinique ne semble pas exister dans ces organes. Cependant, chez le cobaye, dans 2 cas sur 5, l'extrait après chauffage, renfermait une quantité d'acétylcholine supérieure de 30 % à celle de l'extrait avant chauffage.

Nous nous sommes demandée si, en dehors des organes étudiés ci-dessus, dans lesquels nous avons toujours mis en évidence une quantité facilement dosable d'acétylcholine dans l'extrait aqueux sur le muscle de sangsue, il était possible de faire apparaître, par action de la chaleur, de l'acétylcholine dans les tissus ou organes considérés généralement comme n'en renfermant pas. Nous n'avons pu déceler, ni acétylcholine, ni complexe acétylcholine, dans le foie de mammifère (chien, chat, cobaye (1), rat, hérisson) ainsi que dans le foie de grenouille et de poisson (*Scyllium canicula*, *Labrus bergylta*), dans la rate (chien, cobaye), dans la thyroïde (chien), dans le muscle (chien et cobaye).

Remarquons enfin que si dans le foie d'un poisson (*Raia clavata*) nous avons dosé et caractérisé 0,7 γ par gr. d'acétylcholine, nous n'avons pu toutefois mettre en évidence l'existence d'un complexe.

On trouvera inscrits au tableau VIII les chiffres que nous avons obtenus chez les vertébrés tant en acétylcholine libre qu'en acétylcholine totale.

(1) Dans le cas du foie de cobaye nous avons fait la recherche dans l'extrait immédiatement après la préparation. Nous avons montré dans un précédent chapitre (Chapitre II, p. 39) l'apparition d'acétylcholine par autolyse d'une macération de foie de cobaye.

TABLEAU VIII

Quantités d'acétylcholine libre et dissimulée dans quelques organes de Vertébrés. (Les chiffres correspondent à la moyenne de 5 à 15 dosages par organe).

ORGANES	ANIMAL	Acétylcholine libre en γ par gr.	Acétylcholine totale en γ par gr.	Acétylcholine dissimulée en γ par gr.
CERVEAU	Bœuf	0,2	0,4	0,2
	Mouton	0,35	0,8	0,45
	Chien	0,2	0,5	0,3
	Chien (15 jours)	0,5	1,5	1
	Chat	0,8	1,5	0,7
	Chat (4 à 12 jours)	1,1	2,5	1,4
	Lapin	0,8	2	1,2
	Cobaye	1,1	4	2,9
	Rat	0,6	1,9	1,3
	Hérisson	0,7	2,7	2
	Pigeon	1,5	3	1,5
	Grenouille	1,5	5	3,5
	Lézard	2,4	5,6	3,2
	<i>Raia clavata</i>	2	4,5	2,5
	<i>Scyllium canicula</i>	2,5	5	2,5
	<i>Labrus bergylla</i>	1,5	4	2,5
MOELLE	Chat	0,2	0,7	0,5
	Cobaye	1,5	2,2	0,7
	Rat	0,8	1,5	0,7
INTESTIN (Grêle)	Chien	1,5	2,5	1
	Chien (15 jours)	3	6	3
	Chat	1	3	2
	Chat (12 jours)	2	6	4
	Cobaye	1,5	4	2,5
	Lapin	0,8	2	1,2
	Hérisson	2	10	8
	Tortue	1	3	2
	Grenouille	0,1	légt. > 0,1	?
	Lézard	0,1	légt. > 0,1	?
ESTOMAC	Chien	0,3	0,7	0,4
	Cobaye	0,5	1,5	1
	Hérisson	1	2,5	1,5
	Grenouille	0,2	0,7	0,5
	Tortue	0,2	1	0,8
	<i>Raia clavata</i> (muqueuse)	0,5	1	0,5
	<i>Scyllium canicula</i> (muqueuse)	0,5	1	0,5
SS MAXILLAIRE	Chien	1	3	2
	Chat	0,3	0,7	0,4
PANCREAS	Chien	0,15	0,15	0
	Cobaye	0,2	0,15	0
	Chat	2	2,5	+ dans 2 exp. sur 6
	Hérisson	0,4	1,5	1,1
	Pigeon	1,4	1,4	0
	<i>Raia clavata</i>	1,8	1,8	0
CŒUR	Chien	0,2	0,2	0
	Chat	0,3	0,3	0
	Cobaye	0,5	0,5	0
	Hérisson	0,4	0,4	0
SURRENALES	Chien	0,7	0,7	0
	Chat	0,8	0,8	0
	Cobaye	2	2,5	+ dans 2 exp. sur 5

§ 2. — Existence du complexe dans les organes des Invertébrés

En ces dernières années quelques auteurs ont recherché la présence de l'acétylcholine chez les invertébrés et cela afin de préciser chez ces animaux l'existence d'un transmetteur chimique de l'excitation nerveuse.

Nous citerons en particulier les travaux de BACQ (1935-1937) et ceux de JULLIEN et MORIN (1938) ; ces auteurs se sont employés en même temps à rechercher la cholinestérase chez les invertébrés. On trouvera résumé au tableau IX les résultats qu'ils ont obtenus, quant à la teneur en acétylcholine des organes de divers animaux.

Nous nous sommes demandée, s'il était possible, de mettre également en évidence chez les invertébrés, l'existence d'un complexe susceptible de libérer de l'acétylcholine sous l'influence de la chaleur ; nous l'avons recherché dans différents organes de mollusques, de vers et de crustacés.

a) *Système nerveux.* — 1°) **MOLLUSQUES.** — Nos premières recherches (C. MENTZER, E. CORTEGGIANI, J. GAUTRELET, 1936) ont porté sur un mollusque terrestre (*Hélix pomatia*). Nous avons pu mettre en évidence, dans l'extrait aqueux de ganglions cérébroïdes, chez cet animal, 3 à 5 γ d'acétylcholine par gramme ; après chauffage des ganglions à 80°, les quantités d'acétylcholine évaluées également par dosages sur le muscle de sangsue éseriné étaient de 10 à 15 γ par gr. Les ganglions d'escargot renferment donc une grande quantité d'acétylcholine sous forme dissimulée.

Nous avons poursuivi depuis lors une étude analogue chez quelques mollusques marins ; certains de ces animaux présentent des ganglions nerveux très développés et par suite se prêtent particulièrement bien à ces recherches. Rappelons que BACQ et MAZZA (1935) ont caractérisé dans l'extrait trichloracétique de ganglions cérébraux d'*Octopus* de très grandes quantités d'acétylcholine (77 γ par gr.) ; nous avons recherché tout d'abord l'existence du complexe acétylcholinique chez ce mollusque ; les quantités d'acétylcholine contenues dans la suspension aqueuse

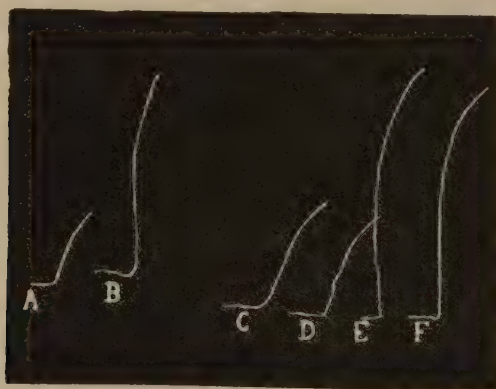
TABLEAU IX

*Indiquant la teneur en Acétylcholine
dans les tissus des Invertébrés.*

Classe	Animal	Tissus	Acétylcholine en γ par gramme	Références
Mollusques céphalopodes	<i>Octopus vulgaris</i>	Ganglions cérébraux	77	Bacq (1935 b et d)
		Estomac et œsophage	1,4	»
		Gl. salivaires post ^{rs}	1,3	»
		Rein	0,36	»
		Ovaire	0,2	»
		Cœur	+ < 0,2	»
		»	+ < 0,1	Vincent et Jullien (1938 a)
		Caecum	+ < 0,2	Bacq
		Foie	0 < 0,2	»
		Muscle	0,1 — 0,7	»
Mollusques gastéropodes	<i>Aplysia depilans</i>	Sang	0	»
		Ganglions	+ +	»
		Pied	0,35	»
		Estomac et œsophage	0,6	»
	<i>Aplysia fasciata</i>	Cœur	0,2	Vincent et Jullien
		Foie	0 < 0,2	Bacq
		Sang	0 < 0,01	»
		Cœur	0,1	Vincent et Jullien
	<i>Helix Lucorum</i>	Cœur	1,3	»
	<i>Helix pomatia</i>	»	2,5 1,5	»
	<i>Helix nemoralis</i>	»	7	»
	<i>Limnaea stagnalis</i>	»	5,3 6,1	»
	<i>Cerithium vulga- tum</i>	»	1,6 2	»
	<i>Murex trunculus</i>	»	23 35	»
	<i>Murex brandaris</i>	»	21	»
Mollusques lamellibran- ches	<i>Pectunculus vio- lascens</i>	Corps entier	0,65	Bacq
	<i>U. io batavus</i>	Sang	0	»
		Cœur	0,2	Vincent et Jullien
	<i>Anodonta cygnea</i>	»	0,3 0,4	»
	<i>Mytilus gallopro- vincialis</i>	»	0,12	»
	<i>Ostrea edulis</i>	»	0,7	»
	<i>Gryphara angulata</i>	»	0,4	»
	<i>Pecten jacobaeus</i>	»	0,2	»
	<i>Pincta nobilis</i>	»	0,7	»
Vers	<i>Halla parthenopea</i>	Corps entier	0,8	Bacq
	<i>Spirographis spallanzani</i>	»	0,5 0,7	»
Siponculiens	<i>Sipunculus nudus</i>	Corps entier	0,9 0,8	»
		Muscle pur	0,7	»
		Sang	0	»
Echinodermes	<i>Holothuria tubu- losa</i>	Muscle longitudinal	1,5 1,7	»
		Intestin	0,4	»
Crustacés	<i>Maia squinado</i>	Organes et Muscles	+ < 0,15	»
	<i>Peneus caramote</i>	Sang	0	»
		Corps entier	0,18	»
	<i>Palinurus vulgaris</i>	Muscles abdomi- naux	0 < 0,1	»
	<i>Lepas anatifera</i>	Corps entier avec péduncule	0,15	»
Ascidies	<i>Ciona intestinalis</i>	Corps entier	0	»
		sans la coque	0	»
		Muscle	0	»
		Sang	0	»

Classe	Animal	Tissus	Acétylcholine en γ par gramme	Références
Ascidies	<i>Phallusia mamillata</i>	Corps entier sans la coque	0	Bacq
Cœlentérés	<i>Adamsia palliata</i>	Corps entier	0	»
	<i>Adamsia rondelleti</i>	»	0	»
	<i>Rhizostoma pulmo</i>	»	0	»
	<i>Alcyonum palmatum</i>	»	0	»
Porifères	<i>Leuconia asperata</i>	»	0	»
	<i>Siphonocula crassa</i>	»	$0 < 0,03$	»
Protozoaires	<i>Paramecium</i>	animal entier	0,27 - 1,08	Bayer et Wense (1936)

ésérinée de ganglions cérébraux d'*Octopus vulgaris* étaient évaluées, avant et après chauffage de celle-ci à 80°, sur le muscle de sangsue ésériné. L'extrait aqueux ésériné, qui ne renferme normalement que 25 γ par gr. d'acétylcholine, contient après chauffage 80 à 100 γ par gr. : 80 p. 100 de l'acétylcholine se trouve donc sous forme de complexe. (tracé 24).



Tracé 24.

Muscle de sangsue ésériné. Action d'un extrait de ganglions d'*Octopus*. en A, 0,5 γ d'acétylcholine — en B, 1 γ d'acétylcholine — en C, 0,02 gr. ganglions en suspension saline ésérinée — en D, 0,5 γ d'acétylcholine — en E, 0,01 gr. ganglions en suspension saline ésérinée, chauffée à 80° — en F, 1 γ d'acétylcholine.

Devant l'importance de ce complexe, nous avons recherché s'il présentait certaines des propriétés précédemment établies pour le complexe du cerveau de mouton, en particulier, stabilité dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 ésérinée et destruction par l'eau.

EXPÉRIENCE 30-9-37 (*tracé 25*) :

Nous avons prélevé chez un poulpe les 2 ganglions optiques. L'un d'eux, après pesée (poids : 0,35 gr.) est broyé et la pulpe obtenue est diluée dans 10 cm³ d'une solution de NaCl à 9 p. 1.000 (préparation I).

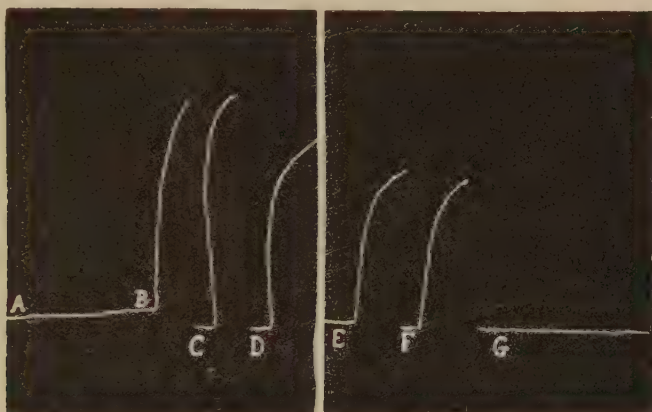
L'autre ganglion (poids : 0,35 gr.), après broyage, est dilué avec de l'eau (préparation II).

Après 15 minutes un même volume des préparations I et II correspondant à 0,11 gr. de tissu frais est ajouté au bain renfermant le muscle de sangsue éseriné. On n'observe, dans les deux cas, aucune contraction.

Les préparations I et II sont portées à 80° pendant 3 minutes et l'acétylcholine est dosée dans chacune d'elle par réaction sur le muscle de sangsue :

— 0 gr. 01 d'organe pour la préparation I (NaCl à 9 p. 1.000) donne une courbe équivalente à 0,6 γ d'acétylcholine.

— 0 gr. 03 d'organe pour la préparation II (H²O) donne une courbe de 0,3 γ d'acétylcholine. — 0,1 gr. de cette même préparation après contact avec 1 cm³ de sérum de cheval ne provoque plus aucune contraction du muscle de sangsue.



Tracé 25. — Muscle de sangsue éseriné (exp. 30-9-37).

Comparaison de l'activité des suspensions aqueuse et saline de ganglions d'*Octopus*.

en A, 0,11 gr. ganglions en suspension saline — en B, 0,6 γ d'acétylcholine en C, 0,01 gr. ganglion en suspension saline chauffée à 80° — en D, 0,5 γ d'acétylcholine — en E, 0,03 gr. ganglion en suspension aqueuse chauffée à 80° — en F, 0,3 γ d'acétylcholine — en G, 0,1 gr. ganglion en suspension aqueuse chauffée à 80° et traitée par le sérum de cheval.

Il résulte de cette expérience, répétée d'ailleurs à plusieurs reprises, que le complexe, qui présente une valeur normale (60 γ par gr. d'acétylcholine libérée par chauffage) dans l'extrait effectué en présence de chlorure de sodium, se trouve en grande partie détruit dans l'extrait aqueux ; dans ce cas, la quantité d'acétylcholine existant après chauffage n'est plus que de 10 γ

par gr. L'eau amène donc une destruction de 80 p. 100 environ du complexe mis en évidence dans les ganglions de l'*Octopus vulgaris*, et par suite ce complexe apparaît de structure analogue à celui du cerveau de mouton.

Chez un autre mollusque céphalopode (*Sepia officinalis*), il nous a été donné également de mettre en évidence l'existence du complexe acétylcholinique. La quantité d'acétylcholine dans les ganglions cérébraux a augmenté de 8 fois sa valeur initiale après chauffage à 80° de la suspension ésérinée ; mais nous n'avons pu faire sur cet animal qu'une seule expérience, faute de matériel.

Enfin, chez un mollusque gastéropode (*Haliotis tuberculata*), il nous a été possible sur 3 lots d'une dizaine d'animaux d'isoler une quantité appréciable de ganglions cérébroïdes (0,5 à 0,6 gr.). La quantité d'acétylcholine libre a été évaluée à 6 γ par gr. environ et la quantité d'acétylcholine totale à 20 γ par gr. Ces valeurs sont tout à fait comparables à celles obtenues précédemment dans les ganglions cérébroïdes de l'escargot.

2°) **VERS.** — Nous avons recherché l'acétylcholine et le complexe dans le système nerveux de la sangsue. Pour obtenir une quantité très minime de substance (0 gr. 1) il nous a fallu prélever les chaînes nerveuses de 200 sangsues. L'essai effectué dans le chlorure de sodium ésériné est resté complètement inactif aussi bien avant qu'après chauffage sur le muscle de sangsue ésériné. Sans doute, les quantités trop faibles de tissu et de plus la destruction possible de l'acétylcholine aussi bien que celle du complexe pendant le temps de la dissection (3 heures environ) ne nous permettent pas de conclure à l'absence d'acétylcholine libre ou dissimulée dans le système nerveux de la sangsue.

3°) **CRUSTACÉS.** — Par contre, il nous a été possible d'isoler chez quelques crustacés une quantité suffisante de tissu nerveux pour rechercher l'acétylcholine et le complexe. Nous avons effectué cette étude sur deux crustacés brachyours, (*Maia squinado* et *Cancer pagurus*) et un crustacé macroure (*Astacus fluviatilis*).

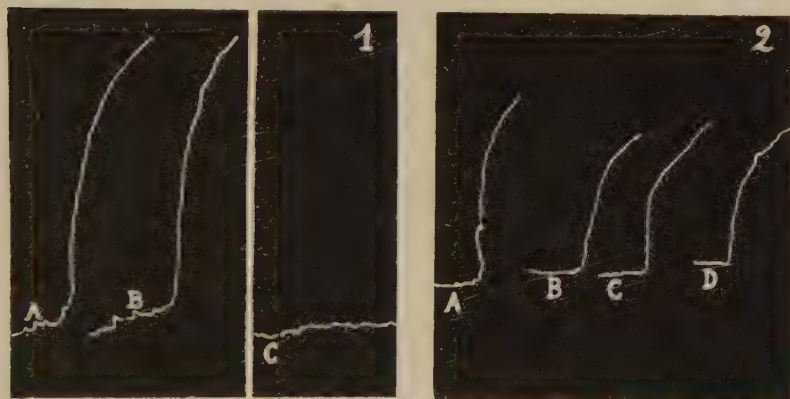
Chez *Maia squinado* et *Cancer pagurus* il est relativement facile de prélever la masse ganglionnaire thoracique. Il est à remarquer que celle-ci est entourée d'une substance conjonctive gélatineuse, plus ou moins abondante, qu'il est impossible de sé-

parer ; la présence de cette substance explique sans doute les résultats assez variables des dosages d'acétylcholine.

Chez *Maia squinado* nous avons mis en évidence 4 à 8 γ par gr. d'acétylcholine libre. Quant au complexe, sur 5 expériences, 2 se sont montrées légèrement positives ; dans un cas en particulier, le rapport entre l'acétylcholine libre et l'acétylcholine totale était de 7 à 10.

Chez *Cancer pagurus*, nous avons montré également la présence dans la substance nerveuse de 15 à 20 γ par gr. d'acétylcholine, il ne nous a pas été donné d'observer chez cet animal la présence de complexe.

Enfin, chez *Astacus fluviatilis*, il est très facile d'isoler les ganglions cérébroïdes et toute la chaîne nerveuse. Nous avons trouvé chez cet animal de très grandes quantités d'acétylcholine, jusqu'à 75 γ par gr. de tissu nerveux, sans toutefois constater l'existence notable de complexe.



Tracé 26.

1. — Muscle de sangsue éseriné — en A, 0,01 gr. système nerveux d'*Astacus fluviatilis* (extrait trichloracétique) — en B, 0,5 γ d'acétylcholine — en C, 0,04 gr. du même extrait après contact avec le sérum de cheval.

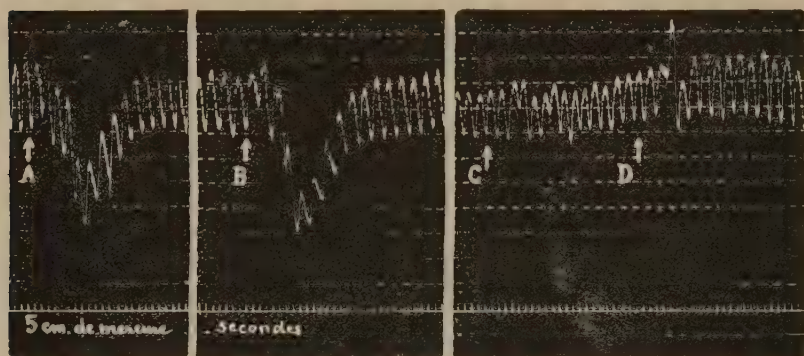
2. — Muscle *rectus abdominis* de grenouille éseriné. — en A, 5 γ d'acétylcholine — en C, 3 γ d'acétylcholine — en B, 0,06 gr. système nerveux d'*Astacus* (extrait trichloracétique) — en D, 3 γ d'acétylcholine.

Afin de caractériser de façon plus certaine l'acétylcholine dans le système nerveux de cet animal, nous avons effectué un *extrait trichloracétique* des ganglions. Les dosages d'acétylcholine dans cet extrait ont été effectués parallèlement sur le muscle de sangsue éseriné, la pression du chat et le muscle *rectus abdominis* de la grenouille. Comme le montrent les *tracés* 26 et 27, les

résultats sont identiques sur les divers tests. Nous remarquons en outre que l'activité de l'extrait est abolie de façon constante par le contact avec le sérum de cheval.

Donc, si nous ne pouvons jusqu'ici affirmer l'existence du complexe acétylcholinique dans le système nerveux des crustacés, cependant nous croyons devoir insister particulièrement sur la présence de quantité très importante d'acétylcholine dans le système nerveux de ces animaux ; en effet, à notre connaissance, l'acétylcholine n'a jamais été signalée, tout au moins en quantité notable chez les crustacés, et BACQ (1935, e) montre l'insensibilité de ces animaux vis-à-vis de cette substance.

Il nous a été donné par ailleurs, de caractériser également l'acétylcholine chez un insecte (*Carabus auratus*).



Tracé 27. — Pression carotidienne du chat.

en A, injection de 0,1 γ d'acétylcholine — en B, injection intraveineuse de 2 mgr. de système nerveux d'*Astacus fluviatilis* (extrait trichloracétique) — en C, 2 mgr. de l'extrait après action du sérum de cheval — en D, 4 mgr. de l'extrait après action du sérum de cheval.

b) *Tube digestif*. — Nous avons mis en évidence le complexe acétylcholinique dans le tube digestif des mollusques (*Octopus vulgaris*, *Sepia officinalis*, *Halotis tuberculata*) et chez les échinodermes (*Holothuria tubulosa* et *Asterias glacialis*).

Devant la difficulté d'éliminer les substances exogènes du tube digestif, nous avons recherché si le plankton ne renfermait pas d'acétylcholine ; dans 1 gr. de plankton nous n'avons trouvé après chauffage aucune trace de cette substance.

c) *Foie*. — Nous n'avons jamais caractérisé l'acétylcholine et le complexe dans l'hépatopancréas d'escargot et pas davantage dans le foie d'*Octopus vulgaris* ou de *Sepia officinalis*.

d) *Glandes salivaires*. — Si dans les glandes salivaires postérieures d'*Octopus vulgaris* nous avons caractérisé 0,5 γ par gr. d'acétylcholine libre, nous n'avons pu mettre en évidence l'existence du complexe.

Nous n'avons pu poursuivre la recherche de l'acétylcholine et du complexe dans les extraits aqueux ésérinés d'un certain nombre d'Invertébrés marins : la plupart des organes renferment une substance exerçant une action inhibitrice vis-à-vis de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue (¹) ; Signalons en particulier sa présence dans le foie et les glandes génitales mâles d'*Octopus vulgaris* dans l'extrait aqueux total de mollusques lamellibranches (*Vénus verrucosa*, *Pecten jacobaeus*), dans le tube digestif d'holothuries et d'oursins et les glandes génitales d'oursins mâles ou femelles. Une substance inhibitrice analogue existant chez les vers (*Arenicola marina*, *Perinereis cultrifera*), chez les siponculiens (*Sipunculus nudus*), dans la plupart des organes des crustacés (*Maia squinado*, *Cancer pagurus*), chez les Actinies (*Actinia equina*, *Anemonia sulcata*) et une Ascidie (*Styelopsis grossularia*) nous n'avons pu rechercher le complexe chez ces animaux.

Cependant, en pratiquant une extraction des divers organes de ces animaux par l'acétone anhydre, il est possible d'éliminer la substance inhibitrice, celle-ci ne passant pas dans le liquide d'extraction. Après évaporation de l'acétone, nous avons recherché l'acétylcholine totale contenue dans l'extrait obtenu, par action sur le muscle de sangsue ésériné. Nous n'avons pu mettre en évidence la présence d'acétylcholine dans le foie et les glandes génitales mâles d'*Octopus vulgaris*, dans l'extrait total de *Vénus verrucosa* et de *Pecten jacobaeus*, et pas davantage dans les glandes génitales d'oursin, dans l'extrait d'*Actinia equina* et dans l'extrait total des organes des crustacés (*Cancer pagurus*, *Astacus fluviatilis*).

Par contre, l'extrait acétonique de siponcle renfermait 4 à 5 γ pr. gr. d'acétylcholine ; bien qu'en quantité moindre nous avons montré la présence d'acétylcholine chez *Arenicola marina* (0,5 γ p. gr.) et *Perinereis cultrifera* (0,3 γ p. gr.).

(1) BACQ (1935 d), a également signalé que les extraits trichloracétiques d'un certain nombre d'organes d'Invertébrés marins, avaient une action inhibitrice vis-à-vis de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue et le muscle *rectus abdominis* de grenouille.

On trouvera résumés au tableau X les résultats de nos expériences chez les invertébrés.

TABLEAU X
Teneur en Acétylcholine libre et dissimulée
chez quelques Invertébrés

Classe	Animal	Organe	Acétylcholine en γ p. gr.		
			Libre	Totale	dissi- mulée
Mollusques céphalopodes	<i>Octopus vulgaris</i> »	Ganglions cérébraux	25	90	65
		Gl. salivaires postérieures	0,5	0,5	0
		Tube digestif Foie ⁽¹⁾	0	0,3 0	+
	<i>Sepia officinalis</i>	Gl. génitales mâles ⁽¹⁾		0	
		Ganglions cérébraux Tube digestif	10 0,5	80 0,8	70 0,3
Mollusques gastéropodes	<i>Helix pomatia</i>	Ganglions cérébroïdes Hépatopancréas	4 0	12 0	8 0
	<i>Haliotis tuber- culata</i>	Ganglions cérébroïdes Tube digestif	5 4	20 7	15 3
	<i>Venus verrucosa</i>	Animal entier privé de muscles ⁽²⁾		0 0	
Mollusques lamelli- branches Vers	<i>Pecten jacobacus</i>	Animal entier ⁽³⁾		0	
	<i>Arenicola marina</i> <i>Perenereis cultrifera</i>	Animal entier ⁽¹⁾ privé d'intestin Animal entier ⁽¹⁾ privé d'intestin		0,5 0,3	
				4 à 5	
Siponculiens Echinodermes	<i>Sipunculus nudus</i>	Animal entier ⁽¹⁾		4 à 5	
	<i>Holothuria tubulosa</i>	Tube digestif	0,4	0,8	0,4
	<i>Asterias glacialis</i> <i>Paracentrotus lividus</i>	Tube digestif	6	12	6
	»	Gl. génitales mâles ⁽¹⁾ d° femelles ⁽¹⁾		0 0,08	
Crustacés	<i>Cancer pagurus</i>	Muscles ⁽¹⁾ Totalité des organes sauf muscles ⁽¹⁾ Ganglions nerveux		0 0 15 à 20	
				15 à 20	0
	<i>Moia squinado</i>	Ganglions nerveux	4 - 8	4 - 12	légt + dans 3 cas s/ 5
Cœlentérés	<i>Astacus fluviatilis</i>	Système nerveux	30 - 75	30 - 75	0
	<i>Actinia equina</i>	Animal entier ⁽¹⁾		0	

(1) L'extrait aqueux éseriné renfermant une substance inhibitrice de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue, le dosage de l'acétylcholine totale a été effectué après extraction acétonique.

(2) Existence d'une substance décontractant le muscle de sangsue même après extraction acétonique.

(3) Existence dans l'extrait acétonique d'une substance contracturant le muscle de sangsue mais différente de l'acétylcholine (non détruite par la soude normale).

En résumé, nous avons recherché un complexe de propriétés analogues à celles du cerveau de mouton dans les organes tant des vertébrés que des invertébrés. Nous avons constaté sa présence, d'une manière générale, dans le système nerveux et dans l'intestin et l'estomac de mammifères, d'oiseaux, de reptiles et de poissons, et dans la glande sous-maxillaire de quelques mammifères. Chez les Invertébrés, les ganglions des mollusques en particulier, se sont montrés très riches en complexe ; si, par contre, nous n'avons pu mettre en évidence, de façon constante, l'existence de complexe dans le système nerveux des crustacés, nous signalons la présence dans celui-ci, d'une grande quantité d'acétylcholine libre. Nous avons montré, en outre, que l'intestin des invertébrés renferme en général, un complexe acétylcholinique.

CHAPITRE VII

Essai de libération de l'acétylcholine du complexe cérébral sous l'influence de divers excitants et dans diverses conditions physiologiques

Nous nous sommes attachée à l'étude des variations du rapport de l'acétylcholine libre à l'acétylcholine dissimulée du cerveau de cobaye en soumettant celui-ci, *in vivo* et parfois *in vitro*, à des excitants variés ou à des conditions physiologiques diverses.

Avant tout, nous avons recherché l'action de l'excitant électrique directement appliqué sur le cerveau, puis dans le même sens de l'injection de sels de potassium, sur la libération d'acétylcholine; nous avons étudié également l'influence de la strychnine.

Nous avons tenté de modifier le métabolisme du cerveau en augmentant ou diminuant les oxydations à l'aide des narcotiques ou en soumettant l'animal à l'anoxhémie. Avec les radiations ultra-violettes nous avons essayé de modifier l'équilibre protidique, enfin nous avons pratiqué l'injection d'ésérine afin de modifier l'activité cholinestérasique.

§ 1. — Action de divers excitants

a) *Excitation électrique du cerveau de cobaye in vivo.* — A l'instar de la moelle, le cerveau excité par le courant induit est-il susceptible de libérer dans les mêmes conditions, de l'acétylcholine? On sait que l'excitation électrique de la moelle épinière isolée fait apparaître dans le liquide de Ringer ésériné une substance qui, sur le muscle de sangsue, présente les caractères de l'acétylcholine (Minz, 1936).

Le cerveau de cobaye est mis à nu à l'aide du trépan électrique, sous une légère anesthésie à l'éther; les méninges sont enlevées et deux fines électrodes d'argent sont enfoncées dans un hémisphère à un centimètre de distance environ et déplacées

de temps en temps. On fait passer, à l'aide d'un chariot d'induction muni de son trembleur et alimenté par un accumulateur de 4 volts, un courant de 15 microcoulombs pendant 15 à 30 minutes. L'animal est sacrifié par section des carotides ; les hémisphères sont prélevés séparément dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 éserinée à 1/20.000 et les dosages de l'acétylcholine libre et totale sont effectués par la méthode habituelle dans l'hémisphère excité et non excité. Nous groupons les résultats de nos expériences dans le tableau XI.

TABLEAU XI

Quantités d'Acétylcholine libre et totale en γ par gr. contenues dans les hémisphères (normal et excité) du cerveau de cobaye.

N° des Expériences	Hémisphère normal		Hémisphère excité	
	Acétylcholine libre	Acétylcholine totale	Acétylcholine libre	Acétylcholine totale
3709 bis			1	4
3744	0.7	3.6	0.8	3.8
3856	1	4	0.9	4.2
3856 bis	0.9	4.1	0.8	4.3

D'après ces expériences, les teneurs aussi bien d'acétylcholine libre que l'acétylcholine totale dans l'hémisphère normal et dans l'hémisphère excité, sont tout à fait comparables. Il n'est donc *pas possible de mettre en évidence, par excitation électrique directe du cerveau de cobaye, la libération d'acétylcholine, ni une modification du complexe.*

b) *Action du potassium.* — BROWN et FELDBERG (1935) ont émis l'idée que le potassium serait susceptible de libérer « *in vivo* » l'acétylcholine du complexe où elle est engagée ; d'après ces auteurs le potassium fait apparaître l'acétylcholine dans le ganglion cervical supérieur perfusé ; BEZNAK avait signalé auparavant (1934) une action analogue du potassium sur le cœur.

Nous avons recherché sur le cobaye l'effet d'injection, soit dans la troisième ventricule ou tout au moins dans la région, soit dans la carotide, d'une solution de chlorure de potassium sur les teneurs en acétylcholine libre et totale du cerveau.

EXPÉRIENCE 3874 :

Nous avons injecté dans le troisième ventricule $0,2 \text{ cm}^3$ d'une solution de chlorure de potassium à 2 p. 100. L'animal présente immédiatement des convulsions et meurt après 10 minutes environ. Le cerveau est immédiatement prélevé, et l'acétylcholine est dosée dans la suspension aqueuse éserinée avant et après chauffage à 80° sur le muscle de sangsue éseriné. L'acétylcholine libre est évaluée à $0,7 \gamma$ par gr. et l'acétylcholine totale à $3,5 \gamma$ par gr.

EXPÉRIENCE 3985 :

Après mise à nu de la carotide, on injecte dans cette artère, après apposition d'une pince du côté cardiaque, 1 cm^3 d'une solution de chlorure de potassium à 1 p. 100, l'animal présente des troubles passagers ; une deuxième injection est pratiquée 10 minutes après et produit un effet identique. Après 10 minutes, l'injection de 2 cm^3 à 1 p. 100 provoque des convulsions amenant la mort de l'animal. Le cerveau est prélevé, les dosages de l'acétylcholine dans la suspension aqueuse éserinée, donnent 1γ par gr. pour l'acétylcholine libre et 4γ par gr. pour l'acétylcholine totale.

Les valeurs de l'acétylcholine libre et totale dans le cerveau de l'animal, injecté avec du chlorure de potassium, restent toujours dans les limites des variations individuelles que nous avons établies précédemment. *Nous ne pouvons donc conclure à une libération d'acétylcholine par le potassium dans le cerveau.*

c) *Action de la strychnine.* — Que le cerveau réagisse à l'application de strychnine par une augmentation de l'excitabilité, le fait est connu de longue date et récemment SJOSTRAND (1937) après BARTLEY (1933) montrait l'apparition de vagues diphasiques dans le cortex du lapin, surtout si une application d'éserine ou d'acétylcholine est concomitante. O. LÆWI en outre, signalait, il y a quelques mois (1937, c), une augmentation de la teneur du cerveau de grenouille en acétylcholine chez l'animal strychnisé.

Ces faits nous ont incité à rechercher les modifications des taux d'acétylcholine, soit sous forme libre, soit sous forme dissimulée dans le cerveau de cobaye, sous l'influence de la strychnine.

L'application locale de strychnine à 1 p. 1.000 sur le cerveau ne nous ayant donné aucun résultat, l'animal ne présentant que des excitations passagères, nous avons pratiqué des *injections sous-cutanées* de cette substance ; la dose convulsivante étant

chez le cobaye très rapidement mortelle, nous avons cru devoir soumettre l'animal à la respiration artificielle afin de lui permettre de supporter pendant plusieurs heures des injections répétées de strychnine.

Nous avons constaté tout d'abord, que la *respiration artificielle* d'ordre physiologique, ne provoquait par elle-même aucune modification sensible dans les taux d'acétylcholine du cerveau.

Nous donnons un protocole d'expérience :

EXPÉRIENCE 3927. Cobaye (poids : 670 grammes) :

- 3 h. 20 Une canule est fixée sur la trachée et l'animal est soumis à la respiration artificielle.
- 3 h. 30 Injection sous-cutanée de 1 cm³ de sulfate de strychnine à 2 p. 1.000.
- 4 h. 15 { nouvelles injections d'une même dose de sulfate de strychnine à 2 p. 1.000.
- 5 h. 00 { — L'animal présente des convulsions pendant toute la durée de l'expérience.
- 6 h. 00 {
- 6 h. 30 Le cobaye est saigné et le cerveau prélevé immédiatement dans une solution de chlorure de sodium éserinée (poids du cerveau : 3 grs. 6).
- 6 h. 40 Dosage de l'acétylcholine sur le muscle de sangsue éseriné avant et après chauffage de la suspension cérébrale.

Résultat du dosage : Acétylcholine libre : 0,55 γ par gr. °
Acétylcholine totale : 1,2 γ par gr.

Dans l'expérience 3927 nous constatons, en comparant les chiffres obtenus aux teneurs moyennes, précédemment déterminées, du cerveau du cobaye en acétylcholine libre (1,1 γ pr. gr.) et en acétylcholine totale (4 γ p. gr.), que la valeur de l'acétylcholine libre est réduite d'environ 50 p. 100 ; quant à l'acétylcholine totale, elle a diminué encore plus nettement. Mais nous devons à la vérité de remarquer que ces résultats n'ont pu être obtenus de façon constante. Nous donnons un tableau résumant nos expériences à ce sujet (tableau XII).

TABLEAU XII

Acétylcholine libre et acétylcholine totale exprimées en γ par gr. dans le cerveau de cobaye soumis à des injections répétées de sulfate de strychnine.

N° d'expériences	Nombre d'injections	Dose totale de strychnine en mgr par kg.	Durée de l'expérience	Acétylcholine		Remarques
				libre	totale	
3912	1	4	20 minutes	1,65	4,4	Mort de l'animal
3920	2	3	55 »	1,35	3,25	
3923	1	0,25		1	3,4	inject. intraosseuse
3923 bis	2	5	2 heures	0,5	2,25	l'animal est sacrifié 5 minutes après la 2 ^e injection qui provoque de fortes convulsions.
3924	2	6	3 heures	1,15	2,8	même remarque
3925	4	16	2 h. 50	0,6	3,3	Respiration artificielle, l'animal meurt à la 4 ^{me} injection
3927	4	12	3 heures	0,55	1,2	Resp. artif.
3933	3	13	3 h. 20	0,5	2	Respiration artificielle, l'animal meurt 30 m après la dernière injection.
3944	2	10	2 h 30	1,2	3,25	Resp. artif.
3948	3	10	2 heures	1,1	3	d°

En établissant la moyenne de ces expériences, nous trouvons après strychnine une valeur de 0,95 γ par gr. pour l'acétylcholine libre et 2,9 γ par gr. pour l'acétylcholine totale. Si la quantité d'acétylcholine libre n'est inférieure que de 10 p. 100 environ à la normale, par contre la teneur en complexe a diminué de 30 p. 100.

Il nous sera permis de signaler que FEGLER, KOWARZYK et LELUSZ-LACHOWICKZ (1938) ont observé également une diminution de la teneur en acétylcholine de l'axe cérébro spinal du lapin sous l'influence des injections de strychnine ; mais remarquons que les dosages étaient effectués sur l'organe broyé ésériné, maintenu à 38° suivant la méthode de STEDMAN E. et E. (1937). Le résultat, disent les auteurs, n'est pas en contradiction avec l'hypothèse d'une libération d'acétylcholine sous l'influence de l'excitation strychnique ; celle-ci formée aux dépens d'une acétylcholine de réserve (dépôt) serait détruite aussitôt par la cholinesté-

rase, d'où la moindre richesse du tissu cérébro spinal *post-mortem*.

Nous constatons donc qu'à l'inverse de ce que LÆWI a observé chez la grenouille, l'injection de strychnine amène chez le cobaye une diminution tout au moins de l'acétylcholine totale du cerveau. Il est possible que cette divergence provienne du fait que LÆWI pratique le dosage de l'acétylcholine sur l'ensemble du système nerveux central (cerveau et moelle) et cela chez la grenouille. Or, on ne saurait oublier que la strychnine est avant tout un excitant médullaire ; nous avons recherché également dans quelques expériences la modification du taux d'acétylcholine dans la moelle du cobaye : bien que nous ayons observé parfois une libération sensible de l'acétylcholine du complexe médullaire, un nombre trop restreint d'expériences ne nous permet pas de tenir compte de ces résultats.

§ 2. — Influence d'agents modificateurs du métabolisme cérébral

Nombre de travaux en ces dernières années ont mis en évidence la forte consommation d'oxygène par le cerveau, alors que celle du nerf est par contre très faible. L'activité respiratoire de la substance grise est de beaucoup supérieure à celle de la substance blanche ; c'est ainsi que pour le cerveau du chien la consommation d'oxygène *in situ* est traduite, suivant la notation généralement adoptée par HIMWICH et NAHUM (1932), par le coefficient $Q_{O_2} = 42$ — c'est-à-dire 42 mm³ d'oxygène par mgr. de substance cérébrale sèche par heure — alors que le coefficient pour la substance blanche n'est que de l'ordre de 1,15.

Tout différents sont au reste les résultats obtenus par l'étude du métabolisme *in vitro* des tranches minces de cerveau à l'aide de la méthode de Warburg en particulier. Le coefficient Q_{O_2} si l'on compare les résultats des différents auteurs (cf. HOLMES, 1937) pour le cortex cérébral ne dépasse pas 15, il est donc inférieur de plus de moitié à celui que l'on observe sur l'animal vivant. Il est à remarquer, par contre, que pour les autres tissus, concordent les résultats *in vitro* et *in vivo*.

a) Action de l'oxygène « *in vitro* ». — A ce sujet sont particulièrement intéressantes au point de vue du métabolisme de l'acétylcholine les expériences de QUASTEL, TENNENBAUM et WHEATLEY (1936). QUASTEL a observé, au cours de recherches où il utilisait l'appareil de Warburg, à partir de tranches de tissu

cérébral maintenues à 37°-38°, la libération en présence d'oxygène de quantités importantes d'acétylcholine dans le liquide physiologique ambiant éseriné. Comme le remarque cet auteur, le fait ne peut s'expliquer par une simple diffusion de l'acétylcholine, la quantité libérée étant de beaucoup supérieure à celle contenue normalement dans l'organe, 4 à 5 fois dans les cas les plus favorables.

Cette acétylcholine est-elle libérée aux dépens du complexe dont nous venons de mettre l'existence en évidence ? La question se posait. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier comment se comportait le complexe au cours des expériences réalisées, suivant les conditions essentielles de QUASTEL. Pour cette étude, nous avons utilisé le cerveau de rat et adopté la technique suivante :

Le cerveau du rat est prélevé rapidement après saignée de l'animal, et partagé en deux parties symétriques. Une des moitiés est coupée en fines tranches de 0,5 à 1mm. d'épaisseur, celles-ci sont introduites dans un tube de verre contenant 20 à 30 cm³ d'une solution saline tamponnée ⁽¹⁾ éserinée à 1/20.000. Le tube est maintenu à 38° au bain-marie et un courant d'oxygène barbotte dans le liquide. Des échantillons du liquide sont prélevés après divers temps et l'acétylcholine y est dosée directement sur le muscle de sangsue éseriné. Après 2 à 3 heures, les tranches de cerveau sont lavées à plusieurs reprises avec la solution saline éserinée et broyées en présence de 2 cm³ de solution éserinée par gr. d'organe (poids initial). Le dosage de l'acétylcholine contenue dans la suspension cérébrale ainsi obtenue est effectué avant et après chauffage de celle-ci sur le muscle de sangsue, et les chiffres obtenus sont comparés à ceux trouvés normalement dans l'autre moitié du cerveau.

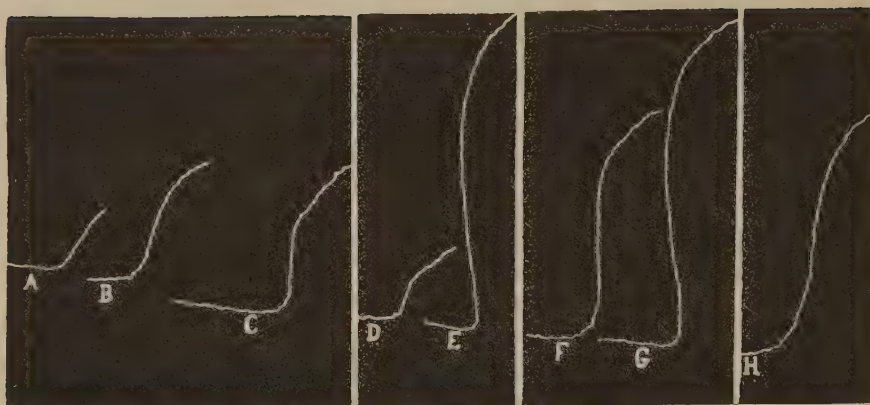
EXPÉRIENCE 3905 (*tracé 28*) :

4 h. 40 Prélèvement du cerveau (poids : 1,5 gr.). Le cerveau est divisé en deux parties symétriques.

(1) Nous avons utilisé une des solutions adoptées par QUASTEL et ses collaborateurs (1936) dont nous donnons la formule :

Phosphate de sodium	3,60	gr.
Chlorure de potassium	0,15	gr.
Chlorure de calcium	0,11	gr.
Chlorure de sodium	7,6	gr.
Glucose	3,6	gr.
Eau distillée q. s.	1.000	gr.

Le pH de cette solution = 7,4.



Tracé 28.

Muscle de sangsue éseriné (exp. 3905). Libération d'acétylcholine dans le cerveau de rat éseriné, oxygéné à 38°.

en A, 2 cm³ du liquide baignant les tranches de cerveau après 40 minutes d'expérience — en B, 0,25 γ d'acétylcholine — en C, 1 cm³ du liquide baignant les tranches de cerveau après 2 heures — en D, 0,2 γ d'acétylcholine — en E, 0,07 gr. cerveau de rat maintenu 2 heures à 38° et chauffé à 80° — en F, 0,07 gr. cerveau de rat non chauffé — en G, 0,9 γ d'acétylcholine — en H, 0,45 γ d'acétylcholine.

- 4 h. 45 1/2 cerveau (poids : 0 gr. 75) est coupé en tranches minces et après 10 minutes broyé en présence de la solution tampon éserinée. L'acétylcholine est dosée dans la suspension avant et après chauffage.

Résultats du dosage : acétylcholine libre : 0,5 γ par gr.

acétylcholine totale : 2 γ par gr.

acétylcholine dissimulée : 1,5 γ par gr.

- 4 h. 50 1/2 cerveau (poids : 0 gr. 75) est coupé en tranches minces : ces tranches sont plongées dans 20 cm³ de la solution tampon et mises au bain-marie à 38° et oxygénées.

- 5 h. 30 Prélèvement de 2 cm³ de liquide qui, ajoutés au bain renfermant le muscle de sangsue, donnent une contraction de 0,15 γ d'acétylcholine.

- 6 h. 50 Prélèvement de 1 cm³ — l'essai sur le muscle de sangsue donne une contraction correspondant à 0,30 γ d'acétylcholine.

- 6 h. 55 Les tranches sont prélevées, lavées à 3 reprises avec 20 cm³ de la solution tampon éserinée, broyées et la pulpe obtenue diluée avec la solution tampon. Le dosage de l'acétylcholine contenue dans la suspension est effectué avant et après chauffage sur le muscle de sangsue éseriné.

Résultats : acétylcholine libre : 6,6 γ par gr.

acétylcholine totale : 13 γ par gr.

acétylcholine dissimulée : 6,4 γ par gr.

Dans l'expérience 3905 nous obtenons donc après 2 heures une libération dans le bain de 6 à 7 γ d'acétylcholine par gr. d'organe. Mais nous insisterons sur le fait que les tranches

d'organe, maintenues à 38° en milieu oxygéné, renferment elles-mêmes des quantités encore plus importantes d'acétylcholine, non seulement sous forme libre, mais à l'état dissimulé. Dans les tranches de cerveau l'acétylcholine libre passe de 0,5 à 6,6 γ par gr. et l'acétylcholine dissimulée de 1,5 à 6,4 γ par gr. Des résultats de même sens ont été obtenus dans une série d'expériences que nous reportons au tableau XIII.

TABLEAU XIII

Quantités d'acétylcholine en γ par gr. libérées dans le liquide extérieur et extraites avant et après chauffage des tranches minces de cerveau de rat maintenues en milieu oxygéné à 38°.

N° d'expérience	Acétylcholine libérée dans le liquide extérieur après :				Acétylcholine dans les tranches à la fin de l'expérience		Acétylcholine dans la moitié de cerveau témoin	
	1/2 h.	1 h.	2 h.	3 h.	libre	totale	libre	totale
3898			2 5	4	2,75	5,5		
3898 bis			2,5	6	3	8	0,8	1,6
3900	1	2	4		4	12	0,8	3,2
3905	2		6 à 7		6,6	13	0,5	2

Quelles conclusions tirerons-nous de l'ensemble de ces expériences rapprochées de celles de QUASTEL ? Sans doute comme cet auteur devons-nous envisager, sous l'influence de l'oxygène, non une simple diffusion dans le liquide extérieur de l'acétylcholine normalement contenue dans le cerveau, mais une néo-formation abondante de cette substance. Ce fait est particulièrement mis en évidence dans nos expériences où, malgré la libération de quantités importantes d'acétylcholine dans le liquide baignant le cerveau, nous avons pu retrouver dans les tranches d'organes après 2 à 3 heures des quantités d'acétylcholine libre atteignant jusqu'à 5 fois le taux normal de l'acétylcholine totale ; qui plus est, *il nous a été donné de constater une augmentation importante de l'acétylcholine dissimulée*, la valeur du complexe étant dans les tranches de cerveau 4 à 6 fois plus grande que normalement.

Convient-il de voir dans le complexe l'origine de l'acétylcholine libérée sous l'influence de l'oxygène ? La question est d'importance. Le rôle du glucose, souligne par ailleurs QUASTEL, et

de ses produits de dégradation n'apparaît pas seulement dans le métabolisme respiratoire du cerveau mais dans d'autres manifestations de son activité, telle la formation d'un ester de la choline. Ce sont de tels produits de dégradation des glucides que E. et E. STEDMAN (1937) envisagent comme « précurseurs » possibles de l'acétylcholine dans leur combinaison avec l'autre « précurseur » qui est normalement la choline de l'organisme. Ces auteurs, opérant non sur les tranches minces comme QUASTEL mais sur la pulpe cérébrale éserinée et chloroformée à 37°, observent la formation d'acétylcholine qu'augmente de 50 p. 100 environ l'addition d'acide acétylacétique ; par contre, après addition de glucose et surtout d'acide lactique et pyruvique, il y a diminution et même suppression de cette synthèse.

Nous ne pouvons enfin que rappeler à ce sujet les travaux de A. MARNAY et NACHMANSOHN (1937 a), mettant en évidence l'influence accélératrice de l'acétylcholine sur la glycolyse du muscle en anaérobiose.

A vrai dire, bien que vu leur intérêt, nous ayons été amenée à parler des expériences de QUASTEL, il ne s'agit là que d'expériences « *in vitro* » dans lesquelles le métabolisme est conservé ; il nous a été donné précédemment de signaler les résultats différents obtenus par les auteurs sur les échanges respiratoires du cerveau « *in vivo* » et « *in vitro* ». Nous n'insisterons pas sur ces données et nous exposerons les recherches que nous avons poursuivies quant à l'influence de la diminution des oxydations sur le taux de l'acétylcholine libre et du complexe dans le cerveau de l'animal normal.

b) *Influence de l'anoxémie.* — Le cerveau est éminemment sensible à l'anoxémie (BARCROFT 1928, HALDANE, 1927) surtout liée à la déficience de glucides. Classiques sont les troubles de l'activité psychique en altitude: quand l'oxygène est réduit de 21 à 14 p. 100 apparaissent des troubles de la respiration ; de 14 à 10 p. 100 l'incapacité intellectuelle est très marquée.

Nous avons donc entrepris une série de recherches destinées à préciser les modifications en acétylcholine libre ou combinée du cerveau de cobaye soumis à des dépressions atmosphériques plus ou moins marquées.

Pour réaliser ces expériences, le cobaye est placé sous une cloche à vide d'une capacité de 20 litres environ. La dépression est effectuée à l'aide de la trompe à eau, un manomètre à mercure

permettant de suivre les variations de pression à l'intérieur de la cloche et une rentrée d'air étant maintenue constamment afin d'éviter l'enrichissement de l'air en CO_2 . Lorsque l'on atteint une dépression de 400 mm. de mercure l'animal commence à présenter des troubles de l'équilibre, et pour une dépression de 600 mm. de mercure se manifestent constamment des troubles respiratoires. L'animal est maintenu pendant 1 à 2 heures à ces fortes dépressions et sacrifié immédiatement après que la pression atmosphérique rétablie permet le soulèvement de la cloche. L'animal se ranimant parfois avant que l'on puisse pratiquer la saignée, dans d'autres expériences nous l'avons soumis en fin de séance à une dépression encore plus poussée amenant la mort. Après prélèvement du cerveau, l'acétylcholine libre et totale y est dosée sur le muscle de sangsue. Dans ces conditions *nous n'avons jamais observé de teneur en acétylcholine libre ou en acétylcholine totale s'écartant des teneurs moyennes de l'animal normal de plus de 10 p. 100.*

c) *Influence des anesthésiques.* — Maintes fois ont été rapprochés les troubles psychiques dus à l'anoxhémie et aux narcotiques, et QUASTEL et WHEATLEY (1932) insistaient sur le fait que les narcotiques étaient susceptibles d'inhiber, à faibles concentrations, les processus d'oxydation par le tissu cérébral des hydrates de carbone ; les narcotiques ne s'opposeraient pas à l'accès d'oxygène aux cellules nerveuses mais à la formation des produits d'oxydation du glucose.

Nous avons spécialement envisagé l'action de l'éther et celle de soneryl (TIFFENEAU, 1923) parmi les barbituriques.

1°) ACTION DE L'ÉTHER. — Les cobayes étaient maintenus sous anesthésie à l'éther pendant 30 à 40 minutes. Nos expériences ont porté sur deux lots de trois animaux. Dans un cas, nous avons obtenu pour l'acétylcholine libre (expérience 3861) 1,1 γ par gr. et pour l'acétylcholine totale 4,5 γ par gr. ; dans l'autre cas, (expérience 3864) l'acétylcholine libre était de 1 γ et l'acétylcholine totale de 5 γ par gr.

2°) ACTION DU SONERYL. — Nous avons injecté au cobaye 5 à 10 cgr. par kgr. de soneryl par voie intra-péritonéale. L'animal s'endort rapidement et l'anesthésie est maintenue pendant 1 heure environ.

Dans les expériences 3980, 3981 et 3981 bis, nous avons

obtenu une moyenne de 1,7 γ par gr. pour l'acétylcholine libre et de 7 γ par gr. pour l'acétylcholine totale. Ces chiffres, bien que très supérieurs à la teneur habituelle de cerveau, ne doivent pas correspondre à une modification due à l'injection de soneryl : en effet dans ce lot la teneur normale du cerveau était exceptionnellement de 1,7 γ par gr. pour l'acétylcholine libre et 6,8 γ par gr. pour l'acétylcholine totale.

Il ne semble pas que l'on puisse conclure de ces expériences à une modification quelconque de la teneur en acétylcholine libre ou dissimulée sous l'influence de l'anesthésie à l'éther ou du soneryl.

§ 3. — Action des agents anticholinestérasiques

L'injection d'ésérine étant susceptible de bloquer l'estérase sanguine, est-elle capable d'augmenter le taux de l'acétylcholine libre et dissimulée du cerveau ? D'une manière générale la question se posait pour toutes les substances anticholinestérasiques. Si nous nous sommes attachée après l'étude de l'ésérine, à celle de la morphine, c'est que F. BERNHEIM et M. BERNHEIM (1936) ont tenté d'expliquer l'action narcotique de cette substance par une accumulation d'acétylcholine liée à son action anticholinestérasique.

C'est à une potentialisation par l'ésérine dans la transmission synaptique que récemment (1937) MILLER attribue les tremblements et la rigidité musculaires observées lors de l'application de cette substance sur le cortex moteur cérébral du chat.

a) *Action de l'ésérine.* — Afin d'injecter des doses plus importantes d'ésérine — car on sait que cette substance provoque des troubles asphyxiques dès que l'on injecte des doses supérieures à 0,5 mgr. par kgr. — nous avons soumis le cobaye à la respiration artificielle ; il nous a été donné de constater que celle-ci n'avait par elle-même aucune action sur les teneurs en acétylcholine du cerveau.

Une injection de sulfate d'ésérine de 1/2 à 1 mgr. était pratiquée dans la carotide de l'animal ; l'animal était sacrifié généralement après 1/2 heure à 1 heure. Nous reportons nos expériences dans le tableau xiv :

TABEAU XIV

Acétylcholine libre et dissimulée en γ par gr. dans le cerveau après injection intracarotidienne de sulfate d'ésérine chez le cobaye.

N° d'expérience	Poids des cobayes en gr.	Doses en mgr.	Durée de l'expérience	Acétylcholine			Remarque
				libre	totale	dissimulée	
3859	500	1 (2inj.)	1 h.	1,9	8	6,1	Respirat. artificielle
3860	450	0,5	40 min. (mort)	1,25	4,5	3,25	— d° —
3865	480	1 (2inj.)	1 h. 30	1,8	5,2	3,4	— d° —
3875	370	0,5	sacrifié immédiat.	2,8	7,5	4,7	sans respir. artific.

Après examen de ce tableau, il est aisé de constater que consécutivement à l'injection d'ésérine il y a *accumulation d'acétylcholine libre* dans le cerveau, les quantités étant en moyenne près de deux fois supérieures aux valeurs normales. Quant au *complexe*, si nous rappelons que sa valeur normale chez le cobaye est de 3 γ d'acétylcholine par gramme de cerveau, nous observons également une *augmentation importante* tout au moins dans 2 cas sur 4.

b) *Action de la morphine.* — F. BERNHEIM et M. BERNHEIM (1936) ont établi qu'à faible concentration la morphine était susceptible d'augmenter considérablement le temps d'hydrolyse de l'acétylcholine par la cholinestérase sanguine. Bien que cette action soit cependant beaucoup plus faible que celle de l'ésérine comme le signalent ces auteurs, nous avons recherché les modifications possibles chez le cobaye des taux d'acétylcholine libre et dissimulée sous l'influence d'injections sous-cutanées de 10 cgr. par kgr. de chlorhydrate de morphine. Nos résultats ont été complètement *négatifs* ; le fait n'est pas pour nous surprendre étant donné que BERNHEIM lui-même n'ajoutait qu'une importance relative à ses conclusions ; il utilisait au reste, comme test biologique de l'acétylcholine, l'intestin de cobaye et nous avons eu l'occasion de montrer la supériorité du muscle de sangsue en l'occurrence.

§ 4. — Action des radiations ultra-violettes

On sait que les rayons ultra-violets, outre qu'ils modifient l'équilibre colloïdal et ont pu être rapprochés de l'acétone et de

l'alcool quant à leur action sur les protides, sont d'autre part doués d'une action destructrice sur les estérases (LÆWI et NAVRATIL, 1926 a).

Comment se comporte l'acétylcholine et le complexe acétylcholinique du cerveau sous l'influence de ces radiations ? Nous avons utilisé comme source de rayons ultra-violets, une lampe Chenaille à brûleur Lasem et nous avons expérimenté sur le cerveau de cobaye « *in vitro* » et « *in vivo* ».

EXPÉRIENCES « *in vitro* » : Après saignée de l'animal, le cer-
était prélevé rapidement dans l'ésérine et partagé symétrique-
ment. Une moitié était conservée à la température du laboratoire,
l'autre était exposée aux rayons ultra-violets à 25 cm. de la
lampe pendant 1 heure. Nous devons dire que dans ces conditions
nous n'avons jamais obtenu de variations appréciables de la
teneur du cerveau irradié en acétylcholine et en complexe par
rapport à celle du cerveau normal.

EXPÉRIENCES « *in vivo* » : Dans la plupart de ces expé-
riences nous avons opéré de la manière suivante : Le cerveau de
cobaye était mis à nu à l'aide du trépan électrique sous une
légère anesthésie à l'éther ; nous avons toujours respecté les mén-
inges. L'animal était exposé à 25 centimètres de la lampe pen-
dant 1 à 2 heures ; dans ce cas la température ne dépassait pas
27° ; afin d'éviter la dessiccation du tissu mis à nu, le cerveau
était humecté légèrement de temps à autre avec un tampon
d'ouate imbibé de chlorure de sodium à 9 p. 1.000. Nous avons
également dans quelques cas, soumis l'animal intact à une irra-
diation de 4 à 6 heures. Nos résultats sont reportés au tableau
XV.

Si nous faisons la moyenne des résultats obtenus dans ces
expériences nous trouvons pour l'acétylcholine libre, 1, 4 γ par
gr. Par comparaison avec la moyenne des teneurs précédemment
établies chez l'animal normal il est possible d'évaluer à 20 ou
25 p. 100 l'augmentation de l'acétylcholine libre sous l'influence
des rayons ultra-violets ; quant à l'acétylcholine dissimulée, nous
ne pouvons tenir compte d'une variation de 10 p. 100 environ vu
le nombre trop restreint d'expériences.

TABLEAU XV

Acétylcholine libre et dissimulée en γ par gr. de substance cérébrale chez le cobaye soumis aux rayons ultra-violet.

No d'expérience	Temps d'irradiation	Acétylcholine			Remarques
		libre	totale	dissimulée	
3866	30 minutes	1,5	4,3	2,8	Cerveau mis à nu
3868	1 heure	1,2	4,5	3,3	»
3868 bis	1 heure	1	4 à 4,5	3 à 3,5	Injection dans une veine fémorale de 4 cgr. de bleu de méthylène.
3869	40 minutes	2	5	3	
3871	4 heures	1,5	4,8	3,3	Animal intact
3872	6 heures	1,2	4	2,8	» »
3888	3 heures	1,4	5,8	4,4	Cerveau mis à nu

DISCUSSION. — Quelles conditions tirerons-nous de l'ensemble de ces données expérimentales ?

Des variations constantes des taux d'acétylcholine libre ou dissimulée ont été enregistrées dans le sens d'une augmentation sous influence de l'ésérine et dans le sens d'une diminution sous l'influence de la strychnine ; les radiations ultra-violettes augmentent légèrement la seule acétylcholine libre. Par contre, aucune modification n'a pu être obtenue par excitation électrique du cerveau ou injection de sels de potassium, et chez l'animal soumis à l'anoxhémie ou à l'action de quelques anesthésiques (éther, soneryl).

Nous devons remarquer que si, dans le cas de l'injection d'ésérine, nous avons obtenu une variation de 100 p. 100 pour la teneur en acétylcholine libre, par rapport à la teneur moyenne établie chez l'animal normal, dans les autres cas les modifications n'atteignent en général que 20 à 30 p. 100. Or, si nous nous reportons au tableau II (p. 48) nous constatons que des variations individuelles importantes sont possibles. La comparaison sur le même animal des taux d'acétylcholine libre et combinée dans chacun des hémisphères normalement et après action d'excitants divers s'imposait *a priori*, et nous avons effectué un certain nombre d'expériences dans ce sens ; mais les conditions de l'expérience ne se prêtent pas toujours à une telle comparaison. Seules peuvent être retenues alors des variations constantes, de même sens et traduisant un excès ou une diminution suffisam-

ment marqué (20 p. 100 au minimum) par rapport au chiffre moyen normalement établi.

On ne saurait cependant objecter la faible valeur des variations enregistrées ; le maintien en d'étroites limites des taux de l'acétylcholine libre et dissimulée « *in vivo* » est sans doute la conséquence d'une réaction d'équilibre existant entre les deux substances.

Quoi qu'il soit, nos expériences ne nous permettent pas de prendre position dans le débat ouvert depuis quelques années quant à l'intervention du médiateur acétylcholinique au niveau des synapses centrales.

DIKSHIT, on le sait, observant des modifications respiratoires et cardiaques par injections intra-ventriculaires d'acétylcholine à l'animal et l'existence de l'acétylcholine dans le liquide céphalo-rachidien, suggérait déjà en 1933 la possibilité de l'intervention de l'acétylcholine sur les noyaux centraux du vague.

BYKOW (1935), BENETATO et MUNTEANU (1936) caractérisaient d'autre part l'acétylcholine dans le sang veineux du bulbe, après excitation du bout central du vague, et MINZ (1936) mettait en évidence la libération de l'acétylcholine par excitation électrique de la moelle et montrait son action sur la chronaxie de subordination (LEFEBVRE et MINZ, 1936). D'autre part, BONNET et BREMER (1937) constatent des modifications de l'activité électrique de l'écorce cérébrale sous l'influence de l'acétylcholine. HENDERSON et WILSON (1936), par l'étude de l'effet des injections intra-ventriculaires d'acétylcholine et d'ésérine, concluent à une libération d'acétylcholine dans les synapses du système nerveux central, et SCHWEITZER et WRIGHT (1937) discutent également cette possibilité à propos de l'action de l'ésérine et de l'acétylcholine sur les centres.

A l'objection que formule HOLMES (1937) suivant laquelle l'ésérine devrait provoquer des convulsions par mécanisme central au cas où l'acétylcholine jouerait un tel rôle, il convient, semble-t-il, d'opposer les expériences dans lesquelles MILLER (1937) observe précisément de tels phénomènes après application d'ésérine sur le cortex. CARDOT, RÉGNIER et SANTENOISE (1926) avaient, d'autre part, mis en évidence qu'après injection d'ésérine l'excitabilité du gyrus chez le chien était accrue ; la chronaxie est diminuée et l'animal est susceptible de présenter une crise épileptiforme, soit locale, soit générale. Enfin, NACHMAN-

SOHN (1937-38 a, b) se basant sur le fait qu'il existe une plus grande concentration en cholinestérase dans la substance grise que dans la substance blanche du cerveau, l'interprète en faveur d'un rôle synaptique de l'acétylcholine.

Rappelons enfin que la similitude existant entre les relations synaptiques dans les ganglions et dans le système nerveux central devait conduire à l'hypothèse d'une médiation chimique dans les synapses centrales (DALE, 1935). Malgré cet ensemble de faits la cause cependant n'est pas aujourd'hui encore entendue et ECCLES (1937) vient récemment d'exprimer qu'une telle extrapolation ne saurait s'imposer.

Nous n'insisterons pas davantage sur ces données. Ce que nous devons retenir de nos expériences, c'est que nous avons pu mettre en évidence des modifications notables dans les taux respectifs de complexe ou d'acétylcholine libre sous l'influence de l'excitation électrique ou de l'injection de potassium, et nous ne saurions en toute objectivité tirer une conclusion en faveur ou non de l'intervention d'un médiateur chimique dans le jeu des synapses cérébrales.

En résumé, nous avons tenté de préciser l'action de divers excitants ou modificateurs du métabolisme cérébral sur la teneur comparée du cerveau « *in vivo* » et « *in vitro* » en acétylcholine libre et en complexe acétylcholinique. Si l'excitation électrique, l'injection des sels de potassium, l'anoxémie, les anesthésiques sont apparemment sans action, nous avons observé que la strychnine diminue la valeur du complexe de 30 p. 100 environ et que l'ésérine provoque l'accumulation d'acétylcholinique libre et parfois l'augmentation du complexe ; les rayons ultra-violets augmentent, mais très légèrement, le taux de l'acétylcholine. Nous retiendrons enfin l'enrichissement considérable en complexe « *in vitro* » de la suspension cérébrale sous l'influence de l'oxygène.

Conclusions

I. — Utilisant avant tout, au cours de nos recherches, comme réactif de l'acétylcholine le test physiologique sensible et spécifique qu'est le muscle de sangsue ésériné, nous avons étudié préalablement le mécanisme de l'action sensibilisante de l'ésérine, et nous avons montré que cette substance agissait sans doute en inhibant l'activité de la cholinestérase du muscle, mais qu'elle était douée également d'une activité propre sur celui-ci.

II. — Nous avons mis en évidence dans la suspension aqueuse ésérinée de cerveau frais de divers mammifères la libération, sous l'influence d'un chauffage à 70°, d'une quantité supplémentaire d'acétylcholine ; celle-ci normalement dissimulée sous forme d'un complexe, n'apparaît pas avant chauffage dans la suspension aqueuse, à l'encontre de l'acétylcholine soluble qu'il est permis de considérer comme acétylcholine libre.

III. — Nous avons étudié les propriétés de solubilité et de stabilité du complexe, renfermant l'acétylcholine dissimulée du cerveau, sous l'influence de divers agents.

Ce complexe est insoluble dans l'eau et dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000. Il est détruit par les acides, par les solvants organiques, alcool, acide trichloracétique, acétone, au même titre que par la chaleur ; il est stable au-dessous de 55°, et une température de 70° est nécessaire pour sa destruction totale. Il est également détruit par la congélation, la dessiccation et partiellement par l'électrolyse.

IV. — Le complexe est détruit rapidement en milieu aqueux, mais il est stabilisé par l'ésérine. Nous insisterons sur l'intérêt de sa stabilité également dans la solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 en l'absence d'ésérine, le fait rendant compte semble-t-il de l'existence *in vivo* du complexe dans le cerveau.

Nous attribuons à la liaison physico-chimique des substances protidiques avec les sels — les protides, à notre sens, servant de support à l'acétylcholine dans le complexe — la résistance qu'oppose celui-ci à l'attaque de la cholinestérase dans les conditions physiologiques.

Nous basons l'hypothèse d'un support protidique sur le fait que la libération d'acétylcholine du complexe est effectuée après action des divers réactifs provoquant la précipitation des substances protidiques, tels les solvants organiques et la chaleur.

Le fractionnement par l'éther après extraction alcoolique ne nous a pas permis de démontrer l'existence d'une liaison de l'acétylcholine avec les lipides.

V. — Il nous a été donné d'effectuer la reconstitution du complexe par addition de chlorure d'acétylcholine à la suspension aqueuse de cerveau. Celle-ci peut être réalisée aussi bien en présence qu'en l'absence d'ésérine. Nous insisterons sur le fait qu'elle ne semble pouvoir être opérée qu'en présence d'organes, tels le cerveau et l'intestin, qui, à l'encontre du foie, renferment normalement le complexe. Nous voyons là un argument en faveur d'une synthèse et non d'une adsorption ; nous n'avons pu, au reste, fixer l'acétylcholine sur la caséine dans les conditions où nous opérons normalement.

VI. — Nous nous sommes attachée à établir l'inventaire d'un complexe, de propriétés analogues à celles du complexe cérébral dans les organes tant des Vertébrés que des Invertébrés. Nous avons constaté sa présence, d'une manière générale, dans le système nerveux et dans l'intestin de mammifères, d'oiseaux, de reptiles et de poissons, et dans la glande sous-maxillaire de quelques mammifères. Chez les Invertébrés, les ganglions des mollusques en particulier se sont montrés très riches en complexe ; si par contre nous n'avons pu mettre en évidence de façon constante l'existence de complexe dans le système nerveux des crustacés, nous signalons la présence dans celui-ci d'une grande quantité d'acétylcholine libre. Nous avons montré, en outre, que l'intestin des invertébrés renferme, en général, un complexe acétylcholinique.

VII. — Enfin, nous avons tenté de préciser *in vivo* et *in vitro*, l'action de divers excitants ou agents modificateurs du métabolisme cérébral sur la teneur comparée du cerveau en acétylcholine libre et en complexe. Si l'excitation électrique, l'injection de sels de potassium, l'anoxhémie, les anesthésiques

sont apparemment sans action, nous avons observé que la strychnine diminue la valeur du complexe de 30 p. 100 environ et que l'ésérine provoque l'accumulation d'acétylcholine libre et parfois l'augmentation du complexe ; les rayons ultra-violets augmentent mais très légèrement le taux de l'acétylcholine libre. Retenons enfin l'enrichissement considérable *in vitro* en complexe de la suspension cérébrale sous l'influence de l'oxygène.

Sans doute ces données expérimentales ne nous permettent pas de conclure, en toute objectivité, à l'intervention aux dépens du complexe de l'acétylcholine en tant que médiateur chimique dans les synapses cérébrales. Nous ne saurions, cependant, faisant état des faibles variations observées quant au rapport de l'acétylcholine libre à l'acétylcholine dissimulée, éliminer le rôle du complexe en tant que précurseur *in vivo* de l'acétylcholine, car le maintien en d'étroites limites des taux de l'acétylcholine sous ses deux formes, peut apparaître comme la conséquence d'une réaction d'équilibre.

Bibliographie

- ABDERHALDEN (E.), PAFFRATH (H.) und SICKEL (H.). — Beitrag zur Frage der Inkret (Hormon) Wirkung des Cholins auf die motorischen Funktionen des Verdauungskanales. — *Arch. f. Physiol.* 1925, 207, 241.
- AMMON (R.). — Die Fermentative Spaltung des Acetylcholins. — *Arch. f. Physiol.*, 1933, 233, 486.
- AMMON (R.) und KWIATKOWSKI (H.). — Die Bildung von Acetylcholin in Serum und Embryonalextrakt. — *Arch. f. Physiol.*, 1934, 234, 269.
- ARNOW (E.). — Effets produced by the irradiation of proteins and amino-acids. — *Physiol. Reviews*, 1936, 671.
- BACQ (Z.-M.). — La transmission chimique des influx dans le système nerveux. — *Ergebn. d. Physiol.*, 1935, 37, 82. a
- BACQ (Z.-M.). — L'Acétylcholine dans les tissus des Invertébrés. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, 243. b
- BACQ (Z.-M.). — La cholinestérase chez les Invertébrés. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, 247. c
- BACQ (Z.-M.). — Les esters de la choline dans les extraits des tissus des Invertébrés. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, 42, 24. d
- BACQ (Z.-M.). — La cholinestérase chez les Invertébrés, l'insensibilité des crustacés à l'acétylcholine. — *Arch. Intern. Physiol.* 1935, 42, 47. e
- BACQ (Z.-M.). — Nouvelles observations sur l'acétylcholine et la cholinestérase chez les Invertébrés. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1937, 44, 174.
- BACQ et MAZZA. — Indentification d'acétylcholine extraite des cellules ganglionnaires d'octopus. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 3, 246.
- BACQ et MAZZA. — Isolement du chloraurate d'acétylcholine à partir d'un extrait de cellules nerveuses d'*Octopus vulgaris*. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1935, 42, 43.
- BARCROFT. — The respiratory function of the blood. — Cambridge Univ. Press, 1928.
- BARSOUM (G.). — The Acetylcholine equivalent of nervous tissues. — *Journ. of Physiol*, 1935, 84, 259.
- BARTLEY. — Action potential of the optic cortex under the influence of strychnine. — *Am. Journ. of Physiol.*, 1933, 103, 392.

- BAYER (G.) und WENSE (Th.). — Ueber den Nachweis von Hormonen in einzelligen Tieren. Cholin und Acetylcholin im Paramecium. — *Arch. f. Physiol.* 1936, **237**, 417. a
- BAYER (G.) und WENSE (Th.). — Die Beeinflussung der Acetylcholinwirkung durch Histamin. — *Arch. f. exp. Path.*, 1936, **182**, 533. b
- BEATTIE (F. J. R.). — A colorimetric method for the determination of choline and acetylcholine in small quantities. — *Bioch. Journ.*, 1936, **30**, 1554.
- BENETATO (Gr.) et MUNTEANU (N.). — Contribution à l'étude de la transmission chimique de l'influx nerveux au niveau des synapses centraux. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 1128.
- BERNHEIM (F.) and BERNHEIM (M.). — Action of drugs on the cholinesterase of the brain. — *Journ. of Pharm.*, 1936, **57**, 427.
- BERNHEIM (F.). — The interaction of acetylcholine, epinephrine and certain other drugs on the isolated small intestine of the rat. — *Journ. of Pharm.*, 1934, **51**, 68.
- BEST, DALE, DUDLEY and THORPE. — The nature of the vasodilator constituents of certain tissue extracts. — *Journ. of Physiol.*, 1927, **62**, 397.
- BEZNAK (A.). — On the mechanism of the autacoid function of parasympathetic nerves. — *Journ. of Physiol.*, 1934, **82**, 529.
- BINET (L.) et MINZ (B.). — Sur un corps du type de l'acétylcholine présent dans le tronc du nerf vague. — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **115**, 1669. a
- BINET (L.) et MINZ (B.). — Sur une substance sensibilisante à l'acétylcholine formée dans le tronc du nerf vague au cours de l'excitation électrique. — *C. R. Soc. Biol.* 1934, **117**, 1029, 1138. b
- BISCHOFF (G.), GRAB (W.) und KAPFHAMMER (J.). — Acetylcholin im Rinderblut. — *Zisch. Physiol. Chem.*, 1931, **199**, 135 ; **200**, 153.
- BISCHOFF (G.), GRAB (W.) und KAPFHAMMER (J.). — Acetylcholin im Warmblüter. — *Ztsch. Physiol. Chem.*, 1932, **207**, 57.
- BLUM (J.-D.). — Contribution à l'étude de l'acétylcholine dans le sang — *Arch. Intern. Physiol.*, 1938, **46**, 86.
- BONNET (V.) et BREMER (F.). — Action du potassium, du calcium et de l'acétylcholine sur les activités électriques spontanées et provoquées de l'écorce cérébrale. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 127.
- BROUN (D.) et SCHEINER (H.). — Sur l'état physico-chimique de l'acétylcholine dans le sang. — *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **201**, 1046.
- BROWN (G.-L.) and FELDBERG (W.). — Effects of potassium chloride on a sympathetic ganglion. — *Journ. of Physiol.*, 1935, **84**, 12 P.
- BYKOW. — Transmission chimique de l'excitation dans les appareils nerveux centraux. — *XV^e Congrès Intern. de Physiol.*, 1935, p. 49.

- CANNON (W.-B.) and BACQ (Z.-M.). — Studies on the conditions of activity in endocrine organs. A hormone produced by sympathetic action on smooth muscle. — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1931, **116**, 392.
- CARDOT (H.), RÉGNIER (J.) et SANTENOISE (D.). — Influence de l'atropine et de l'ésérine sur la chronaxie du gyrus sigmoïde. — *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1334.
- CHANG (H. C.). — Penetration of preformed acetylcholine in human placenta. — *Chinese Physiol. Soc.* 1935 Proc. 8 th. Annual Meeting. a
- CHANG (H. C.). — Rate of Formation of Acetylcholine in Placenta in vitro. — *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* 1935, **32**, 1001. b
- CHANG (H. C.). and GADDUM (J. H.). — Choline esters in Tissue extracts. — *Journ. of Physiol.* 1933, **79**, 255.
- CHANG (H. C.) and WONG (A.). — Origine and Fate of acetylcholine in human placenta. — *Chinese Journ. Physiol.* 1933, **7**, 151.
- CHANG (H. C.) WEN (I. C.) and WONG (A.). — On the site of occurrence formation and significance of acetylcholine in human placenta. — *XV^e Intern. Physiol. Congress.* USSR, 1935, p. 54.
- CLARK (A. J.). — The action of ions and lipoids upon the frog's heart. — *Journ. of Physiol.* 1913, **47**, 66.
- CLARK (A. J.). — General Pharmacology. — *Handbuch der Exp. Pharm.* 1937, **4**, p. 73.
- COLLIN (R.). — Les glandes annexes du système neuro végétatif. — *La Médecine*, Septembre 1937.
- CORTEGGIANI (E.). — Recherches sur l'acétylcholine libre et combinée dans le cerveau. — *C. R. Soc. Biol.* 1937, **124**, 1197. a
- CORTEGGIANI (E.). — Influence de l'ésérine sur la stabilité du complexe libérant l'acétylcholine par chauffage. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 944. b
- CORTEGGIANI (E.). — Existence du complexe libérant l'acétylcholine sous l'influence de la chaleur dans divers organes de vertébrés. — *C. R. Soc. Biol.* 1937, **125**, 949. c
- CORTEGGIANI (E.), GAUTRELET (J.), KASWIN (A.), et MENTZER (C.). — Sur l'existence d'un complexe libérant l'acétylcholine dans les centres nerveux sous l'influence de la chaleur. — *C. R. Soc. Biol.* 1936, **123**, 667.
- CORTEGGIANI (E.), GAUTRELET (J.), HALPERN (N.), et SERFATY (A.). — Action inhibitrice de l'aldéhyde formique sur l'activité de la cholinestérase du sang. — *C. R. Soc. Biol.* 1936, **121**, 316.
- CORTEGGIANI (E.), CARAYON-GENTIL (A.) GAUTRELET (J.), KASWIN (A.). — Reconstitution in vitro du complexe libérant l'acétylcholine du cerveau. — *C. R. Soc. Biol.* 1937, **125**, 945.

- DALE (H. H.). — The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. — *Journ. of. Pharm.* 1914, **6**, 147.
- DALE (H. H.). — Nomenclature of fibres in the autonomic system and their effects. *Journ. of. Physiol.* 1933, **80**, 10 P.
- DALE (H. H.) and DUDLEY (H. W.). — The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse. — *Journ. of. Physiol.* 1929, **68**, 97.
- DALE (H. H.) and FELDBERG (W.). — Chemical transmission at motor nerve endings in voluntary muscle. — *Journ. of. Physiol.* 1934, **81**, 39 P.
- DALE (H.) and GASSER (H. S.). — The Pharmacology of denervated mammalian muscle. (I). The nature of the substances producing contracture. — *Journ. of. Pharm.* 1926, **29**, 53.
- DIKSHIT (B. B.). — Action of acetylcholine on the brain and its occurrence therein. — *Journ. of Physiol.* 1934, **80**, 409.
- DIKSHIT (B. B.). — The presence in the brain of a substance resembling acetylcholine. — *Journ. of. Physiol.* 1933, **79**, 1.
- DODEL et DASTUGUE. — Etude pharmacodynamique du muscle dorsal antérieur de sangsue, réactif biologique de l'acétylcholine. — *Bull. Sc. Pharm.* 1937, p. 145.
- DONOMAE. — Die acetylcholinartigen Stoffe im Pfortaderblut der Katze. — *Arch. f. Physiol.* 1934, **234**, 318.
- DUDLEY (H. W.). — The alleged occurrence of acetylcholine in ox blood. — *Journ. of. Physiol.* 1933, **79**, 249.
- ECCLES (J. C.). — Synaptic and neuro muscular transmission. — *Physiol. Reviews*, 1937, **17**, p. 538.
- EGLTON (P.). — The action of pure phosphatides on the perfused heart of the frog. — *Biochem. journ.* 1926, **26**, 395.
- EMMELIN (N.) und KAHLSON (G.). — Über Beziehungen zwischen Kontraktionsgrosse von Kreatinin und Acetylcholin. — *Skand. Arch. f. Physiol.*, 1937, **77**, 297. a
- EMMELIN (N.) und KAHLSON (G.). — Versuche zur Deutung des Antagonismus zwischen Curare, Pentamethylentetrazol und Pyridin carbonsäure-diaethylamid. — *Skand. Arch. f. Physiol.*, 1937, **77**, 312. b
- ENGELHART (E.). — Die Vagusstoffverteilung auf Vorhof und Kammer bei Frosch und Säuger. — *Arch. f. Physiol.*, 1930, **225**, 721.
- ETTINGER (G. H.) and HALL (G. E.). — Acetylcholin in Ox and Dog blood. — *Journ. of. Physiol.*, 1934, **82**, 38.
- EULER (U.S.) v.-and GADDUM (J. H.). — An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. — *Journ. of. Physiol.*, 1931, **72**, 74.

- EWINS (A. J.). — Acetylcholine a new active principle of ergot. — *Bioch. Journ.*, 1914, **8**, 44.
- FEGLER, KOWARZYK und LELUSZ-LACHOWICKZ. — Ueber den Einfluss von Tetanus, Toxin und Strychin auf der Acetylcholingehalt des zentralen Nervensystems. — *Klin. Woch*, 1938, **1**, 240.
- FELDBERG (W.). — Die Wirkung von Histamin und Acetylcholin auf die glatte Muskulatur und ihre Beeinflussung durch Atropin. — *Revue de Pharmacologie*, 1933, **2**, 311.
- FELDBERG (W.) und ROSENFELD (P.). — Der Nachweis eines acetylcholinartigen Stoffes im Pfortaderblut. — *Arch. f. Physiol.*, 1933, **232**, 212.
- FELDBERG (W.) and SCHILD. — Distribution of choline and acetylcholine in suprarenal glands. — *Journ. of. Physiol.* 1934, **81**, 37 P.
- FELDBERG (W.) and SCHRIEVER (H.). — The acetylcholine content of the cerebro-spinal fluid of dogs. — *Journ. of. Physiol.*, 1936, **86**, 277.
- FLEISCH (A.), SIBUL (I.), et KAELEN (M.). — De l'apparition de l'acetylcholine dans le sang. — *Arch. Intern. Physiol.*, 1936, **44**, 24.
- FONTAINE (Th.). — Action sur le muscle de sangsue de divers poisons musculaires et de différentes substances biologiques. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 1.045.
- FRANCK (E.). — Die parasymphatische Innervation der quergestreiften Muskulatur und ihre klinische Bedeutung. — *Klin. Woch*, 1920, **31**, 725.
- FRANCK (E.), NOTHMANN (N.), und HIRSCH KAUFFMANN (H.). — Ueber die « tonische » Kontraktion des quergestreiften Säugtiermuskels nach Ausschaltung der motorischen Nerven. Untersuchungen an der Muskulatur der Extremitäten. — *Arch. f. Physiol.*, 1923, **198**, 391.
- FRANEL (L.). — L'acetylcholine dans le sang chez l'animal à l'état de repos et de travail musculaire. — *Arch. Intern. Physiol.* 1935, **41**, 266.
- FRÉDÉRICQ (H.). — La transmission humorale des excitations nerveuses. — *Rapp. Soc. Biol.*, 1927.
- FÜHNER (H.). — Die quantitative Bestimmung des Cholins auf biologischen Wege. — *Bioch. Ztsch.*, 1916, **77**, 408.
- FÜHNER (H.). — Ein Vorlesungsversuch zur Demonstration der erregbarkeitsteigernden Wirkung des Physostigmins. — *Arch. f. exp. Path.*, 1918, **82**, 81.
- FÜHNER (H.). — Untersuchungen über den Synergismus von Giften. Die chemische Erregbarkeitsteigerung glatter Muskulatur. — *Arch. f. exp. Path.*, 1918, **82**, 51. a
- FÜHNER (H.). — Untersuchungen über die periphere Wirkung des Physostigmins. — *Arch. f. exp. Path.*, 1918, **82**, 205. b

- GADDUM (J.-H.). — Gefasserweiternde Stoffe der Gewebe. — Leipzig
Georges Thieme, 1936.
- GALEHR (O.) und PLATTNER (F.). — Ueber das Schicksal des Acetyl-
cholins im Blute. — *Arch. f. Physiol.*, 1928, **218**, 488 et 506.
- GAUTRELET (J.) et THOMAS (L.). — Influence de l'ablation des surré-
nales sur le système nerveux. — *C. R. Acad. Sc.*, 1911, **1**, 895.
- GAUTRELET (J.). — La choline, son rôle hypotenseur dans l'organisme
Contribution à l'étude des coordinations fonctionnelles. — *C. R.
Acad. Sc.*, 1909, **1**, 995 et *Journ. Physiol. et Path. gén.*, 1909,
227. a
- GAUTRELET (J.). — Le diabète expérimental. Contribution à l'étude des
synergies fonctionnelles. — *Journ. de Méd. de Bordeaux*, 1909,
14 Février. b
- GAUTRELET (J.). — Contribution à l'étude de la choline dans l'orga-
nisme animal. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 449.
- GAUTRELET (J.), CORTEGGIANI (E.), KASWIN (A.) et MENTZER (C.). — Li-
bération diastasique d'acétylcholine par le foie. — *C. R. Soc.
Biol.*, 1936, **123**, 664.
- GAUTRELET (J.), CORTEGGIANI (E.), KASWIN (A.) et SERFATY (A.). — Du
mécanisme de la sensibilisation du muscle de sangsue par l'é-
sérine vis-à-vis de l'acétylcholine. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**,
377.
- GOLLWITZER-MEIER (K.). — Zur Frage des Acetylcholins im Rinder-
blut. — *Arch. exp. Path.*, 1934, **174**, 456.
- GOLLWITZER-MEIER (K.) und KRUEGER. — Acetylcholin in Frischmilz
und Frischblut. — *Arch. exp. Path.*, 1934, **176**, 642.
- GUGGENHEIM (M.) und LOFFLER (W.). — Ueber das Vorkommen und
Schicksal des Cholins im Tierkorper. — *Bioch. Ztsch.*, 1916,
74, 209.
- GULEWITSCH (W.). — Ueber Cholin und einige Verbindungen dessel-
ben. — *Ztsch. Physiol. Chem.*, 1898, **24**, 513.
- HALDANE (J.-S.). — Respiration. — *Yale University Presse, Newhaven*,
1927.
- HALPERN (N.) et CORTEGGIANI (E.). — Etude comparative de la destruc-
tion de l'acétylcholine par divers organes de cobaye, de gre-
nouille et d'escargot. — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 1.049.
- HAUPSTEIN (P.). — Das Acetylcholin in dem menschlichen Placenta.
— *Arch. f. Gynék.*, 1932, **151**, 262.
- HENDERSON and WILSON. — Intraventricular injection of acetylcholine
and eserine in man. — *Quart. Journ. of exp. Physiol.*, 1936,
26, 83.
- HIMWICH and NAHUM. — The respiratory quotient of the Brain. —
Amer. Journ. of Physiol., 1932, **101**, 446.

- HOFFMANN (E.). — Ueber die Hydrolyse von Acetylcholinchloridlosungen. — *Helv. Chim. Acta.*, 1930, **13**, 138.
- HOLMES (E.). — Biochemical approaches to the study of the function of the nervous system — *Perspectives in biochemistry*, 1937, Cambridge, p. 308.
- HUNT (R.). — Note on a blood pressure lowering body in the suprarenal gland. — *Am. Journ. of Physiol.*, 1899, **3**, 18.
- HUNT (R.). — Vasodilator reactions. — *Am. Journ. of Physiol.*, 1918, **45**, 197, 231.
- HUNT (R.) and DE TAVEAU (R.). — On the physiological action of certain choline derivatives and new methods for detecting choline. — *Brit. Med. Journ.*, 1906, **2**, 1.788.
- ING and WRIGHT. — Further studies on pharmacological properties of onium salt. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1934, B, **114**, 48.
- ING and WRIGHT. — The curariform action of quaternary ammonium salts. — *Proc. Roy. Soc. London*, 1932, B, **109**, 337.
- JULLIEN (A.), VINCENT (D.), BOUCHET (M.) et VUILLET (M.). — Libération d'acétylcholine à partir du myocarde de quelques mollusques. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1.134.
- KAHANE (E.). — L'acétylcholine dans le sang. — *Journ. Méd. Pharm. Lille*, Mars 1934.
- KAHANE (E.). — Le sel de Reinecke. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1935, [8], **22**, 254.
- KAHANE (E.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. L'acétylcholine du sang. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 479.
- KAHANE (E.). — La choline en biochimie. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 205.
- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur la présence à l'état dissimulée d'une substance acétylcholinique dans le sang normal. *C. R. Acad. Sc.*, 1936, **202**, 1.210. a
- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les substances biologiques. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, **18**, 505. b
- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Inhibition de l'hydrolyse de l'acétylcholine par le sérum. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1.596. c
- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur le mécanisme de la sensibilisation à l'acétylcholine. — *C. R. Acad. Sc.*, 1937, **204**, 1.752. a
- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. Action des muscles de sangsue et de grenouille sur quelques ammoniums quaternaires à fonction ester. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 976. b

- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Influence de quelques agents antiestériques sur l'activité pharmacodynamique de l'acétylcholine. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 252. c
- KAHANE (E.) et LÉVY (J.). — Sur la présence à l'état dissimulé d'une substance acétylcholinique dans le sang normal. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, **19**, 777. d
- KAHLSON (G.). — Zum biologischen Nachweis von Cholin und Acetylcholin. — *Arch. f. exp. Path.*, 1932, **169**, 34.
- KAHLSON (G.). — Nachweis und Vorkommen des praformierten Acetylcholins in Blut und Geweben. — *Arch. f. exp. Path.*, 1934, **175**, 198.
- KAHLSON (G.) und ROEMER (R.). — Enthalt das normale Blut chemisch nachweisbares Acetylcholin. — *Arch. f. exp. Path.*, 1934, **175**, 223.
- KAHLSON (G.) und UVNAS (B.). — Zur Theorie der Sensibilisierung für Acetylcholin, zugleich Bericht über eine erregbarkeitssteigernde Wirkung des Fluorids. — *Scand. Arch. f. Physiol*, 1935, **72**, 215.
- KAPFHAMMER (J.) und BISCHOFF (C.). — Acetylcholin und Cholin aus tierischen Organen. — *Ztsch. Physiol. Chem.*, 1930, **191**, 179.
- KWIATKOWSKI (H.). — Acetylcholingehalt der Nerven des Gehirns und Rückenmarks. — *Arch. f. exp. Path.*, 1935, **177**, 154.
- LANARI (A.). — Los Transmisores quimicos. — Thèse Buenos-Aires, 1936.
- LAPICQUE (L.). — Excitants et paralysants dans le domaine du système nerveux autonome. — *Ann. de Physiol*, 1934, **10**, 555.
- LARSON. — Alleged occurence of acetylcholine and adrenalin in cat's saline. — *Journ. of Pharm.*, 1935, **54**, 341.
- LEFEBVRE et MINZ (B.). — Intermédiaires chimiques dans la régulation chronaxique médullaire. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 1.302.
- LE HEUX (J.-W.). — Cholin als Hormon der Darmbewegung. — *Arch. f. Physiol.*, 1918, **173**, 8 ; 1919, **179**, 177 et 1921, **190**, 280.
- LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E.). — Sur les solutions injectables de chlorure d'acétylcholine. Solutions aqueuses et solutions anhydres. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1932, **15**, 49.
- LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE (E. et M.). — Dosage de la choline et de l'acétylcholine. Détermination de l'indice de décomposition de l'acétylcholine. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1931, **13**, 371.
- LÉVY (J.) et OLSZYCKA (L.). — Recherches sur la biochimie de la choline et de ses dérivés. Technique de dosage biologique de l'acétylcholine. — *Bull. Soc. Chim.*, 1936, **18**, 490.
- LOACH. — The alleged occurence of acetylcholine in normal ox blood. — *Journ. of Physiol*, 1934, **82**, 118.

- LOEWI (O.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung. — *Arch. f. Physiol.*, 1921, **189**, 239 ; 1922, **193**, 201.
- LOEWI (O.). — Ueber eine wasserunlosliche Zustandsform des Acetylcholins im Zentralnervensystem. — *Naturwissenschaften*. — 1937, p. 461. a
- LOEWI (O.). — Ueber eine wasserunlosliche Zustandsform des Acetylcholins im Zentralnervensystem des Froches. — *Arch. f. Physiol.*, 1937, **239**, 430. b
- LOEWI (O.). — Strychninerregung und Acetylcholingehalt des Zentralnervensystems. *Naturwissenschaften*. — 1937, p. 526. c
- LOEWI (O.) und NAVRATIL (S.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung ; über das Schicksal des Vagusstoffes. — *Arch. f. Physiol.*, 1926, **214**, 678. a
- LOEWI (O.) und NAVRATIL (E.). — Ueber den mechanismus der Vaguswirkung von Physostigmin und Ergotamin. — *Arch. f. Physiol.*, 1926, **214**, 689. b
- MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.). — Recherches sur la nature et la stabilité des liaisons protéides-lipides du sérum sanguin. Etude de l'extraction des lipides par l'éther en présence d'alcool. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, **14**, 1.168.
- MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Action des substances sympathomimétiques et parasympathomimétiques sur les processus chimiques fournissant l'énergie de la contraction musculaire. II. action de l'acétylcholine. — *Bull. Soc. Chim.*, 1937, **19**, 445. a
- MARNAY (A.) et NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le nerf de Homard. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 1.005. b
- MATTHES (K.). — The action of blood on acetylcholine. — *Journ. of Physiol.*, 1930, **70**, 338.
- MENTZER (C.), KASWIN (A.), CORTEGGIANI (E.) et GAUTRELET (J.). — Contribution à l'étude de la choline et de l'acétylcholine chez les Invertébrés. Recherches dans les organes d'*Hélix pomatia*. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **123**, 668.
- MILLER. — The local action of eserine on the central nervous system. — *Journ. of Physiol.*, 1937, **91**, 212.
- MINZ (B.). — Pharmakologische Untersuchungen am Blutegelpräparat; zugleich eine Methode zum biologischen Nachweis von Acetylcholin bei Anwesenheit anderer pharmacologisch wirksamer korpereigener Stoffe. — *Arch. f. exp. Path.*, 1932, **168**, 292.

- MINZ (B.). — Sur la libération par la moelle épinière d'un corps du type de l'acétylcholine. — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 1.214.
- NACHMANSOHN (D.). — La transmission de l'influx nerveux dans le système nerveux central. — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126**, 783.
- NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans les tissus embryonnaires. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 670. a
- NACHMANSOHN (D.). — Cholinestérase dans le tissu nerveux. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 894. b
- NACHMANSOHN (D.) et BACQ (Z.-M.). — Cholinestérase dans les muscles des crustacés. — *Journ. of Physiol.*, 1937, **89**, 368.
- GETTINGEN (V.) and BOWMAN. — The physico chemical properties of some new choline derivatives in relation to their chemical constitution and pharmacologic action. — *Journ. of Pharm.*, 1933, **48**, 333.
- PETRUNKINA (A.) et PETRUNKINE (M.). — Etude analytique des rapports entre les acides et les bases dans l'écorce cérébrale. — *Journ. de Physiol. et Path. Gle.*, 1935, 1.103.
- PLATTNER (F.). — Acetylcholinartige Substanz in den Nebennieren und in einigen anderen Organen. — *Arch. f. Physiol.*, 1934, **234**, 258.
- PLATTNER (F.) und GALEHR (O.). — Uber das Schicksal des Acetylcholins im Blute. VI. Der Einfluss verschiedener Narkotica auf die Spaltung des Acetylcholins. — *Arch. f. Physiol.*, 1928, **220**, 606.
- PLATTNER (F.) und HINTNER (H.). — Die Spaltung von Acetylcholin durch Organextrakte und Korperflüssigkeiten. — *Arch. f. Physiol.*, 1930, **225**, 19.
- PLATTNER (F.) und KRANNICH (E.). — Ueber das Vorkommen eines acetylcholinartigen Korpers in den Skelettmuskeln. — *Arch. f. Physiol.*, 1932, **229**, 730. — **230**, 356. — **230**, 705 et 1933, **232**, 342.
- PLATTNER (F.) und TSUDZIMURA (H.). — Acetylcholin und Cholin in Organextrakten. — *Arch. f. Physiol.*, 1935, **236**, 173.
- QUASTEL (J.-H.). — Biochemistry and mental disorder. — Perspectives in Biochemistry. — Cambridge, 1937, p. 296.
- QUASTEL (J.-H.), TENNENBAUM (M.) and WHEATLEY (A. H. M.). — Choline ester formation in, and cholinesterase activities of tissues in vitro. — *Bioch. Journ.*, 1936, **30**, 1.668.
- QUASTEL (J.-H.) and WHEATLEY (D.-H.). — Narcosis and oxydations of the Brain. — *Proc. Roy. Soc.*, 1932, B, **112**, 60.

- RIESSER (O.). — Ueber die durch Azetylcholin bewirkte Erregungskontraktur des Froschmuskels und ihre antagonistische, Beeinflussung durch Atropin, Novakain und Kurare. — *Arch. f. exp. Path.*, 1921, **91**, 342.
- ROUSSY (G.) et MOSINGER (M.). — Neurocrinie, Neuricrinie et transmission humorale des excitations nerveuses. — *Presse Médicale*, 1937, 1.187.
- SJOSTRAND. — Potential changes in the central cortex of the rabbit arising from cellular activity and the transmission of impulses in the white matter. — *Journ. of Physiol.*, 1937, **90**, P.
- STRACK (E.), NEUBAUER (E.) und GEISSENDORFER (H.). — Ueber den Cholin bzw. Acetylcholingehalt der menschlichen Placenta. — *Ztsch. f. Physiol. Chem.*, 1934, **239**, 1. 25.
- STRACK (E.), NEUBAUER (E.) und GEISSENDORFER (H.). — Ueber Cholingehalt bzw. Acetylcholingehalt tierischer Gewebe. — *Ztsch. f. Physiol. Chem.*, 1933, **220**, 217.
- STEDMAN (E.) and STEDMAN (E.). — Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. — III et IV — The inhibitory action of certain synthetic urethanes on the activity of liver esterase. — *Bioch. Journ.*, 1931, **25**, 1.147 et 1932, **26**, 1.214.
- STEDMAN (E.) and STEDMAN (E.). — The mechanism of the biological synthesis of acetylcholin. — I. The isolation of acetylcholin produced by brain tissu in vitro. — *Bioch. Jour.*, 1937, **31**, 817.
- SCHWEITZER (A.) and WRIGHT (S.). — The antistrychnine action of acetylcholin prostigmine and related substances and of central vagus stimulation. — *Journ. of Physiol.*, 1937, **90**, 310.
- TESCHENDORF. — Beitrage zur Physiologie und Pharmakologie der Blutegelmuskulatur. — *Arch. f. Physiol.*, 1921, **192**, 135.
- TIFFENEAU (M.). — Sur quelques nouveaux acides dialcoylbarbituriques dissymétriques. — *Bull. Soc. Chim. de France.*, 1923, **33**, 195.
- TREMONTI (P.). — Contributo alla fisiologia della Milza. Esiste un ormone splenico. — *La Riforma medica.*, 1930, **2**, 1.383.
- VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — La teneur en acétylcholine du cœur des mollusques. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 334. a
- VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — Contribution à l'étude de la cholinestérase chez les invertébrés : la cholinestérase de l'hémolymphe des mollusques. — *C. R. Biol.*, 1938, **127**, 628. b
- VINCENT (D.) et JULLIEN (A.). — L'activité cholinestérasique des extraits myocardiques chez les mollusques. — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 631. c

- VOGELFANGER (I.). — Ueber das Vorkommen von Acetylcholin im Rinderblut. — *Ztsch. Physiol. Chem.*, 1933, **214**, 109.
- VILLARET, BESANÇON (J.) et CACHERA. — Recherches expérimentales sur quelques esters de la choline. — Masson, éd., 1934.
- WEBSTER (M.-D.). — The quantitative action of acetylcholine and histamine on the guinea pig uterus. — *Journ. of Physiol.*, 1935, **53**, 340.
- WITANOWSKI (W.-R.). — Ueber humorale Uebertragbarkeit der Herznervenwirkung. — *Arch. f. Physiol.*, 1925, **208**, 694.
- WREDE und KEIL. — Acetylcholin im Rinderblut. — *Bioch. Ztsch.*, 1931, **104**, 229.
- ZIPF und WAGENFELD. — Ueber die pharmacologische Wirkung des frisch defibrinirten Blutes. — *Arch. f. Path.*, 1930, **150**, 70.
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	9
---------------------------	---

CHAPITRE I

Caractérisation et dosage de l'acétylcholine dans les milieux biologiques	13
--	----

§ 1. — <i>Méthodes d'extraction</i>	13
---	----

a) Extrait alcoolique	13
b) Extrait acétonique	14
c) Extrait trichloracétique	14
d) Extrait métaphosphorique	14
e) Extrait aqueux ou salin.....	15
f) Comparaison des différents modes d'extraction.....	15

§ 2. — <i>Méthodes de dosage</i>	16
--	----

A. <i>Méthodes chimiques</i>	16
------------------------------------	----

B. <i>Méthodes biologiques</i>	18
--------------------------------------	----

a) Cœur de grenouille	18
b) Intestin isolé	19
c) Utérus isolé	20
d) Pression sanguine	20
e) Gastrocnémien énérvé de chat.....	22
f) Cœur d'escargot	23
g) Muscle droit de l'abdomen' de grenouille.....	23
h) Muscle dorsal de sangsue.....	24
1° Technique	25
2° Spécificité d'action de l'acétylcholine.....	28
3° Mécanisme de sensibilisation par l'ésérine.	29

CHAPITRE II

Acétylcholine dans les tissus. — Etat dissimulé de l'acétylcholine	
---	--

§ 1. — <i>Acétylcholine dans le sang et les organes</i>	33
---	----

§ 2. — <i>Origine de l'acétylcholine</i>	37
--	----

a) Formation par synthèse directe.....	37
b) Existence d'une forme dissimulée de l'acétylcholine.	37
1° Acétylcholine dissimulée dans le sang.....	38
2° Acétylcholine dissimulée dans les organes....	39

CHAPITRE III

L'acétylcholine dans le cerveau. — Mise en évidence d'un complexe capable de libérer l'acétylcholine sous l'influence de la chaleur.....	41
§ 1. — <i>Acétylcholine libre et dissimulée dans l'extrait total de cerveau.....</i>	42
a) Préparation de l'extrait.....	42
b) Action sur le muscle de sangsue ésériné de la suspension cérébrale normalement et après chauffage.....	42
c) Identification de la substance active.....	43
§ 2. — <i>Acétylcholine libre et dissimulée dans les différentes régions du cerveau.....</i>	50

CHAPITRE IV

Etude in vitro des propriétés du complexe cérébral.....	53
§ 1. — <i>Propriétés du complexe étudiées en présence d'ésérine.....</i>	53
a) Action de l'eau.....	53
b) Action du chlorure de sodium à 9 p. 1.000.....	54
c) Action du pH.....	54
d) Action des solvants organiques.....	55
e) Action de la température.....	62
f) Action de la congélation.....	63
g) Action de la dessiccation.....	64
h) Action de l'électrolyse.....	65
§ 2. — <i>Etude de la stabilité du complexe en milieux aqueux et physiologique. — Influence de l'ésérine.....</i>	66
a) Comparaison de la stabilité du complexe dans une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1.000 ésérinée et non ésérinée.....	67
b) Stabilité du complexe étudiée comparativement après dilution dans l'eau ésérinée et non ésérinée.....	68
c) Comparaison de la stabilité du complexe en milieux aqueux et salin également ésérinés.....	69
d) Action du chlorure de sodium à différentes concentrations sur la stabilité du complexe.....	70

CHAPITRE V

Hypothèses sur la nature du complexe. — Sa reconstitution in vitro.....	77
§ 1. — <i>Hypothèses sur la nature du complexe.....</i>	77

a) Liaison de l'acétylcholine avec les protides.....	77
b) Liaison de l'acétylcholine avec les lipoprotéides....	78
§ 2. — <i>Reconstitution du complexe in vitro</i>	79
a) Technique	79
b) Influence du temps de contact de l'acétylcholine ajoutée sur la formation du complexe.....	82
c) Influence des quantités d'acétylcholine ajoutées à la suspension cérébrale sur la formation du complexe.	82
d) Reconstitution du complexe en présence d'ésérine.	83
e) Essai de formation d'un complexe acétylcholinique par addition d'acétylcholine à des organes autres que le cerveau	85

CHAPITRE VI

Existence d'un complexe acétylcholinique dans divers organes de Vertébrés et d'Invertébrés..... 89

§ 1. — <i>Existence du complexe dans les organes des vertébrés</i>	89
a) Système nerveux	90
b) Intestin	90
c) Estomac	92
d) Glandes sous-maxillaires	93
e) Pancréas	93
f) Cœur	93
g) Surrénales	94
§ 2. — <i>Existence du complexe dans les organes des Invertébrés</i>	96
a) Système nerveux	96
b) Tube digestif	102
c) Foie	102
d) Glandes salivaires	103

CHAPITRE VII

Essai de libération de l'acétylcholine du complexe cérébral sous l'influence de divers excitants et dans diverses conditions physiologiques..... 107

§ 1. — <i>Action de divers excitants</i>	107
a) Excitation électrique	107
b) Action du potassium.....	108
c) Action de la strychnine.....	109

§ 2. — <i>Action d'agents modificateurs du métabolisme cérébral</i>	112
a) Action de l'oxygène <i>in vitro</i>	112
b) Influence de l'anoxhémie	116
c) Influence des anesthésiques	117
§ 3. — <i>Action des agents anticholinestérasiques</i>	118
a) Action de l'ésérine	118
b) Action de la morphine	119
§ 4. — <i>Action des radiations ultra-violettes</i>	119
<i>Discussion</i>	121
Conclusions	125
Bibliographie	129



DEUXIÈME THÈSE



Propositions données par la Faculté

RÔLES PHYSIOLOGIQUES DES STÉROLS.

Vu et approuvé :

Paris, le 25 Mai 1938.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU

et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

G ROUSSY.

